

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS – UFR Sciences
Ecole Doctorale des Sciences de la vie et de la santé (ED 85)

THESE

Pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences
De l'Université de Nice-Sophia Antipolis

Spécialité : Interactions Moléculaires et Cellulaires

Présentée et soutenue par **Franck Ceppo**

Rôle de la kinase inflammatoire Tpl2 dans l'inflammation du tissu adipeux lors de l'obésité

Soutenue le Lundi 8 Décembre 2014 au Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire
(C3M) de l'Université de Nice-Sophia Antipolis

Jury composé de :

Dr. Ez-Zoubir AMRI

Dr. Tarik ISSAD

Dr. Franck PEIRETTI

Pr. Isabelle CASTAN-LAURELL

Dr. Jean-François TANTI

Président de jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Directeur de thèse

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS – UFR Sciences
Ecole Doctorale des Sciences de la vie et de la santé (ED 85)

THESE

Pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences
De l'Université de Nice-Sophia Antipolis

Spécialité : Interactions Moléculaires et Cellulaires

Présentée et soutenue par **Franck Ceppo**

Rôle de la kinase inflammatoire Tpl2 dans l'inflammation du tissu adipeux lors de l'obésité

Soutenue le Lundi 8 Décembre 2014 au Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire
(C3M) de l'Université de Nice-Sophia Antipolis

Jury composé de :

Dr. Ez-Zoubir AMRI

Dr. Tarik ISSAD

Dr. Franck PEIRETTI

Pr. Isabelle CASTAN-LAURELL

Dr. Jean-François TANTI

Président de jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Directeur de thèse

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	6
CHAPITRE I : OBESITE, TISSU ADIPEUX ET INSULINORESISTANCE.....	7
I.1 PHYSIOPATHOLOGIE DE L'OBESITE.....	7
I.1.1 Définition de l'obésité et indices diagnostic	7
I.1.2 Diabète de type 2 et insulino-résistance : deux complications majeures de l'obésité	10
I.1.3 Causes de l'obésité et du diabète de type 2.....	12
I.1.4 Traitements de l'obésité et du diabète	14
I.1.4.1 Les traitements de l'obésité.....	14
I.1.4.2 Les traitements du diabète de type 2	15
I.2. LES TISSUS ADIPEUX.....	18
I.2.1 Le tissu adipeux brun	18
I.2.2 Le tissu adipeux médullaire	20
I.2.3 Le tissu adipeux blanc.....	20
I.2.3.1 Composition et structure	20
I.2.3.2 Fonctions du tissu adipeux.....	21
I.3. ROLE ET SIGNALISATION DE L'INSULINE	27
I.3.1. Rôle physiologique de l'insuline	27
I.3.2. La voie de signalisation de l'insuline.....	28
I.3.2.1 Le récepteur de l'insuline	29
I.3.2.2 Les protéines adaptatrices IRS (Insulin Receptor Substrate)	30
I.3.2.3 Les Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) de classe 1	31
I.3.2.4 La Phosphoinositide Dependent Kinase-1 (PDK-1)	32
I.3.2.5 Les Protéines Kinase B (PKB)	32
I.3.2.6 Les Protéines Kinase C atypiques (PKC)	33
I.3.2.7 Le transport de glucose	33
I.3.3. Régulations négatives de la voie de signalisation de l'insuline	34
I.3.3.1 Inhibition du récepteur de l'insuline	34
I.3.3.2 Inhibition d'IRS-1	36
I.3.3.3 Les lipides phosphatases	37
I.3.3.4 Les céramides et la nitrosylation	37
CHAPITRE II : INFLAMMATION DU TISSU ADIPEUX ASSOCIEE A L'OBESITE ET L'INSULINORESISTANCE	38
II.1. GENERALITES	38
II.2 CAUSES DE L'INFLAMMATION DU TISSU ADIPEUX.....	40
II.2.1 Nutriments et inflammation du tissu adipeux.....	40
II.2.2 Stress du réticulum endoplasmique et inflammation du tissu adipeux.....	42
II.2.3 Hypoxie et inflammation du tissu adipeux	46
II.2.4 Modification du microbiote intestinal et inflammation du tissu adipeux	48
II.3 MEDiateurs CELLULAIRES DE L'INFLAMMATION DU TISSU ADIPEUX.....	51
II.3.1 Adipocytes et inflammation du tissu adipeux	51
II.3.2 Les macrophages du tissu adipeux.....	52
II.3.2.1 Polarisation des macrophages, inflammation du tissu adipeux et insulino-résistance	52
II.3.2.2 Facteurs impliqués dans l'augmentation des macrophages du tissu adipeux lors de l'obésité.....	56

II.3.3 Les cellules dendritiques du tissu adipeux	59
II.3.4 Les différentes populations de granulocytes du tissu adipeux	60
II.3.5 Les mastocytes du tissu adipeux	62
II.3.6 Les cellules lymphoïdes du tissu adipeux	63
CHAPITRE III : VOIES DE SIGNALISATION INFLAMMATOIRES IMPLIQUEES DANS	
L'INSULINORESISTANCE	67
III.1. TOLL LIKE RECEPTEUR (TLR) ET INSULINO-RESISTANCE	67
III.2 NOD, INFLAMMASOME ET INSULINO-RESISTANCE	69
III.3 ROLE DE LA VOIE IKK/NF- κ B DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INSULINO-RESISTANCE	71
III.3.1 Structure et mécanismes d'action du complexe IKK (Inhibitor κ B Kinase)	71
III.3.2 Implication de la voie IKK/NF- κ B dans l'altération de la signalisation insulinique et dans le métabolisme adipocytaire	73
III.3.3 Apports des animaux génétiquement modifiés pour la voie IKK/NF- κ B	74
III.3.4 Apports des inhibiteurs pharmacologiques	75
III.4 ROLE DES MAP KINASES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INSULINO-RESISTANCE	75
III.4.1. Les différentes familles des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)	75
III.4.2 Implication des MAP kinases dans l'altération de la signalisation de l'insuline et l'inflammation associée à l'obésité et au diabète	78
III.4.4 Apports des animaux génétiquement modifiés dans l'implication des MAP kinases dans la physiopathologie de l'insulino-résistance	80
III.4.4.1 Les souris génétiquement modifiées pour la voie ERK	80
III.4.4.2 Les souris génétiquement modifiées pour la voie JNK	81
III.4.5 Apports des inhibiteurs pharmacologiques dans l'implication des MAP kinases dans la physiopathologie de l'insulino-résistance	83
III.5 LA MAP3KINASE TPL2 : UNE CIBLE POTENTIELLE POUR LE TRAITEMENT DES MALADIES INFLAMMATOIRES ..	84
III.5.1 Généralités	84
III.5.2 Structure de Tpl2 et mécanismes d'action	85
III.5.3 Implication de Tpl2 dans l'inflammation et la prolifération cellulaire	86
III.5.4 Conséquences de l'invalidation de Tpl2 chez la souris	88
RESULTATS	91
ARTICLE N°1	92
IMPLICATION OF THE TPL2 KINASE IN THE INFLAMMATORY CHANGES AND INSULINRESISTANCE INDUCED BY THE INTERACTION BETWEEN ADIPOCYTES ANDMACROPHAGES.....	92
ARTICLE N°2	96
INVOLVEMENT OF THE TPL2 KINASE IN COX-2 EXPRESSION AND PROSTAGLANDIN E2 PRODUCTION IN ADIPOCYTES	96
ARTICLE N°3	100
A SMALL-MOLECULE INHIBITOR OF THE MAP3 KINASE TPL2 PROTECTS AGAINST DIABETIC-RELATED PANCREATIC β -CELL DYSFUNCTION AND DEATH	100
REVUES	103
Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance	103
Implication of MAP kinases in obesity-induced inflammation and insulin resistance	103
RESULTATS NON PUBLIES	104
IMPLICATION DE TPL2 DANS LES EFFETS CHIMIO-ATTRACTEURS DES ADIPOCYTES VIS-A-VIS DES MACROPHAGES ..	104
IMPLICATION DE TPL2 DANS L'INFLAMMATION DU TISSU ADIPEUX ASSOCIEE A L'HYPOXIE	112
DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES	120
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	132

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABP: Adaptor Binding Protein
Alox5: Arachidonate-5-Lipoxygenase
AMPc: Adenosine MonoPhosphate cyclique
aPKC: atypical Protein Kinase C
APS: Adaptor Protein with a PH and SH2 domain
AS160: AKT Substrate of 160 kDa
ASC: Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD
ATF: Activating Transcription Factor
ATGL: Adipose Triglyceride Lipase
CCL: Chemokine C motif Ligand
COX: Cyclo-Oxygénase
CRP: C-Reactive Protein
CXCL: Chemokine C-X-C motif Ligand
ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase
FABP: Fatty Acid Binding Protein
FOXO: forkhead box protein transcription factor
G6P: Glucose 6-Phosphatase
GAP: GTase Activating Protein
GLP-1: Glucagon Like Peptide 1
GLUT: Glucose Transporter
Grb: Growth factor receptor bound protein
GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3
GWAS: Genome-Wide Association Studies
HDL: High Density Lipoprotein
HNF: Hepathocyte Nulcear factor
IFN: Interferon
I κ B: Inhibitor of nuclear factor-kappa B
IKK: Inhibitor of nuclear factor-kappa B kinase
IL- : Interleukine-

IL-1Ra: Interleukine-1 receptor antagonist
IMC: Indice de Masse Corporelle
iNOS: NO Synthase inductible
IPF-1: Insulin Promoter Factor-1
IR : Insulin receptor
IRE1: Inositol Requiring Enzyme
IRS : Insulin Receptor Substrate
JIP1: JNK-interacting protein-1
JNK: c-Jun amino terminal Kinase
kDa: KiloDalton
LHS: Lipase Hormono-Sensible
LPL: Lipoprotéine Lipase
LPS: Lipopolysaccharides
MAP2K: MAP Kinase Kinase
MAP3K: MAP Kinase Kinase Kinase
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein-1
MEK: MAPK/ERK Kinase
MGL: Monoglycéride Lipase
MODY: Mature-Onset Diabetes of the Young
mTOR: Mammalian Target Of Rapamycine
NEMO: NF- κ B essential modulator
NF- κ B: nuclear factor kappa B
NKT: Natural Killer T
NLRP: Nucleotide-binding domain Leucine-rich Repeat
NOD: Nucleotide Oligomerization Domain
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
P110: catalytic subunit of PI3K
P38MAPK: p38 mitogen activated protein kinase
P85: adaptor subunit of PI3K
PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAMP: Pathogen-Associated Molecular Patterns

PKC-1: Phosphoinositide-dependent protein kinase 1

PEPCK: Phosphoenolpyruvate CarboxyKinase

PERK PKR-like Endoplasmicreticulum Kinase

PGC1 α : PPAR γ coactivator 1 α

PH domain: Pleckstrin Homology domain

PI3-K: Phosphatidylinositol 3-kinase

PIP: Phosphatidylinositol Phosphate

PKA: Protein Kinase A

PKB/Akt: Protein Kinase B

PKC: Protein Kinase C

PPAR: Peroxisome Proliferator Activated receptor

PTB domain: Phosphotyrosine Binding domain

PTEN: Phosphatase and Tensin homology

PTP: Phosphotyrosine Phosphatases

PTP1B: Phosphotyrosine Phosphatases 1B

RBP4 : Retinol Binding Protein 4

SH2 domain: Src Homology 2 domain

SOCS: Supressor Of Cytokine Signaling

TGF β : Transforming Growth Factor beta

TLR: Toll Like Receptor

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

Tpl2: Tumor Progression Locus 2

UCP-1: uncoupling Protein 1

UPR: Unfolded Protein Response

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VLDL: Very Low density Lipoprotein

XBP-1: X-box Binding Protein 1

INTRODUCTION

Chapitre I : Obésité, Tissu adipeux et insulino-résistance

I.1 Physiopathologie de l'obésité

I.1.1 Définition de l'obésité et indices diagnostic

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit l'obésité comme «une accumulation anormale ou excessive de graisse qui présente un risque pour la santé ». Ce surpoids résulte d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. L'énergie excédentaire est stockée au niveau du tissu adipeux amenant à un développement anormal et excessif de la masse grasse. L'origine de l'obésité est multifactorielle combinant des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux tels que les aspects qualitatifs et quantitatifs de l'alimentation ainsi que l'activité physique. Cette pathologie est également extrêmement hétérogène en termes de déterminants et de présentations phénotypiques.

Depuis 1997, l'OMS a reconnu l'obésité comme une pathologie chronique. Sa prévention est un problème important de santé publique puisque cette pathologie touche dans les pays développés toutes les classes sociales et plus particulièrement les classes les plus défavorisées et que les pays en voie de développement sont également confrontés à ce problème. Ainsi, d'après les estimations de l'OMS de 2008, 35 % de la population adulte dans le monde serait en surpoids (1,4 milliard de personnes) et 11 % obèse (200 millions d'hommes et 300 millions de femmes). En 2011, l'OMS estime qu'il y avait au moins 40 millions d'enfants de moins de 5 ans en surpoids et prévoit que d'ici 2015 la population mondiale en surpoids devrait atteindre les 2,3 milliards et la population obèse les 700 millions d'individus.

L'indice de masse corporelle (IMC, en anglais Body Mass Index ou BMI) est reconnu au niveau international comme un indicateur évaluant le statut pondéral et l'obésité. Pour les adultes, l'indice de masse corporelle est défini par le rapport de la masse (exprimée en kilogramme) sur le carré de la taille (en mètre). L'IMC est corrélé à la masse grasse corporelle et il existe une relation en U ou en J entre l'IMC et le risque de mortalité. L'IMC permet ainsi de définir plusieurs degrés d'obésité (tableau 1).

Obésité Viscérale

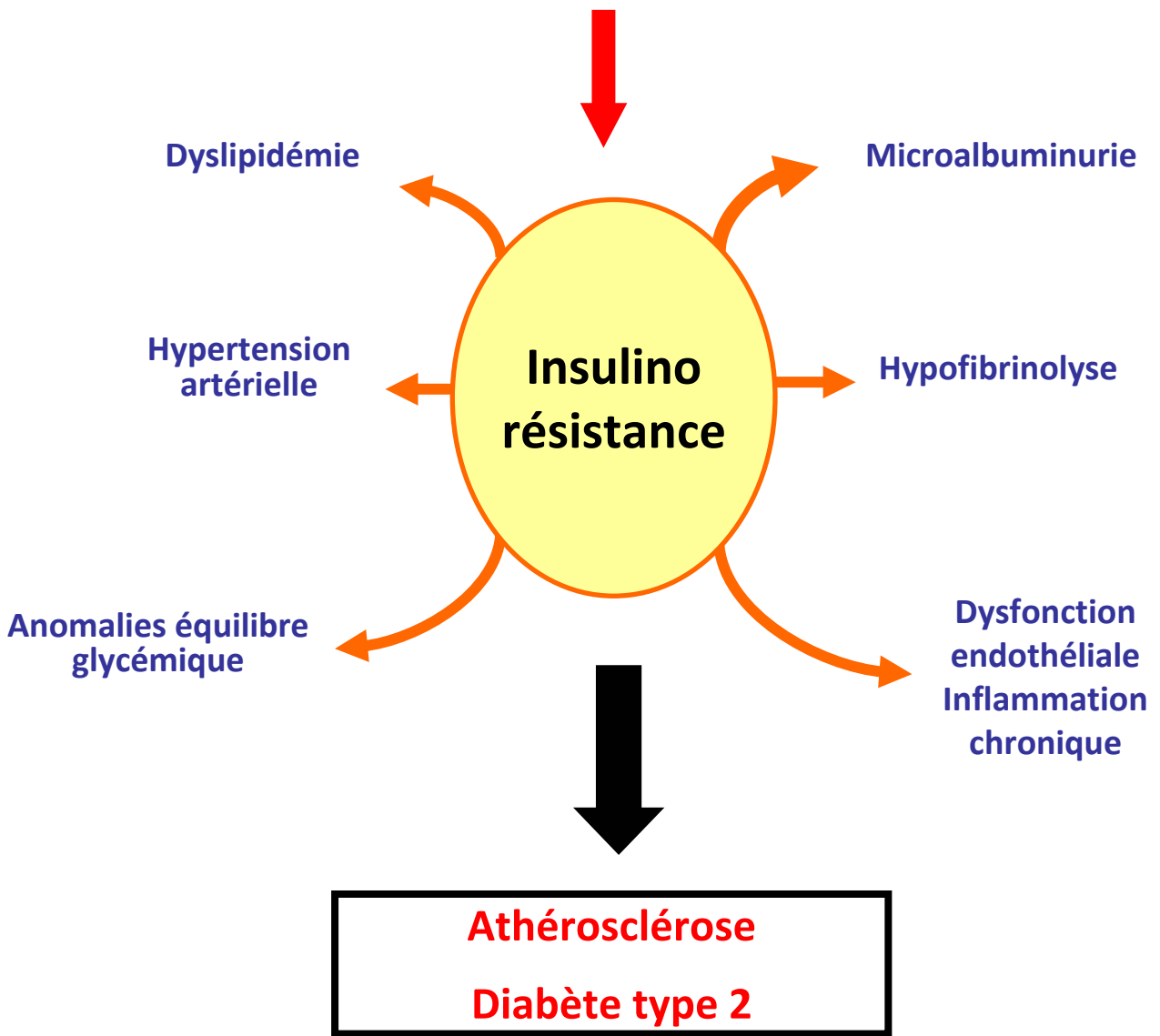


Figure 1 : Les complications métaboliques associées à l'obésité

Indice de masse corporelle IMC (kg/m ²)	Degré d'obésité (selon l'OMS)
< 18,5	Poids insuffisant
18,5 – 24,9	Poids normal
25,0 – 29,9	Surpoids
30,0 – 34,9	Obésité modérée
35,0 – 39,9	Obésité sévère
≥ 40	Obésité morbide

Tableau n°1 : Classification du degré de surpoids ou d'obésité selon l'IMC

En France, l'étude ObEpi-2012 a révélé que 32,3% des Français adultes de 18 ans et plus étaient en surpoids ($25 \leq \text{IMC} < 30 \text{ kg/m}^2$) et 15% (environ 6 900 000 personnes) présentaient une obésité ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$).

L'IMC est une mesure simple et utile, mais qui présente des limites dont il faut tenir compte. Il ne rend pas compte de la variabilité des phénotypes d'obésité entre individus et entre populations. A titre d'exemple, les normes de l'IMC présentées dans le tableau 1 concernent principalement une population caucasienne par contre chez les sujets asiatiques, les seuils d'IMC sont plus bas car ces populations ont en général une proportion de masse grasse plus élevée par rapport aux sujets cauciens. L'IMC ne donne pas une indication précise sur la composition corporelle et ne permet donc pas de différencier entre masse grasse et masse maigre ce qui peut entraîner également des biais. Ainsi un IMC élevé peut être trouvé chez des sportifs avec une masse musculaire très importante. L'IMC ne tient pas compte de la répartition du tissu adipeux qui impacte comme nous le verrons sur les risques de morbidité et de mortalité. Enfin bien que les seuils d'IMC aient une spécificité élevée, ils ont une sensibilité réduite pour identifier la masse grasse. Ainsi, certaines études ont montré que plus de la moitié des sujets avec une adiposité élevée n'étaient pas caractérisés par un IMC élevé (Okorodudu et al., 2010).

Ainsi, même si l'IMC reste une mesure facile du statut pondéral en première intention, d'autres méthodes sont utilisées pour avoir une idée précise de la masse grasse totale et des risques de morbidité ou de mortalité. Les méthodes anthropométriques (mesure des plis cutanés en plusieurs sites) et l'impédancemétrie sont des méthodes simples d'emploi et

largement diffusées. Les techniques d'imagerie médicale comme l'absorptiométrie à double faisceaux de rayon X (DEXA pour Dual-energy-X-ray absorptiometry) est considérée comme une méthode étalon pour mesurer la composition corporelle chez l'homme. Cette méthode permet de déterminer la masse grasse, la masse maigre et la masse calcique osseuse. Cependant ces méthodes ne donnent pas, ou peu, d'informations sur la répartition des dépôts adipeux. Hors, depuis les travaux pionniers du Professeur Jean Vague à Marseille (Vague, 1956), il est clairement établi que l'obésité viscérale ou androïde caractérisée par l'accumulation de tissu adipeux au niveau du tronc et de l'abdomen augmente le risque cardiovasculaire et le risque de dysfonctions métaboliques (risques cardio-métaboliques) par rapport à l'obésité gynoïde caractérisée par une répartition fémorale et sous-cutanée des dépôts adipeux. La mesure du tour de taille ainsi que la circonférence des hanches permettent d'établir un rapport taille sur hanche (RTH) reflétant l'accumulation de masse grasse dans la région du tronc et de l'abdomen. De nombreuses études épidémiologiques démontrent une association forte entre augmentation du RTH et risque cardiovasculaire indépendamment de l'IMC (Larsson et al., 1984). Cependant, la mesure uniquement du tour de taille a été montrée comme plus fortement associée à la graisse viscérale abdominale que le RTH. Le tour de taille est donc maintenant considéré comme un bon indicateur de la masse grasse intra-abdominal et son augmentation est associée à une majoration du risque cardio-métabolique. Ainsi, les femmes et les hommes dont le tour de taille est supérieur respectivement à 80 cm et 94 cm ont un risque cardio-métabolique augmenté. Ce risque est très augmenté pour des tours de taille supérieurs à 88 cm chez les femmes et 102 cm chez les hommes (JAMA, 2001). Il faut cependant noter que la mesure du tour de taille pour prédire le risque cardio-métabolique est utile pour des sujets dont l'IMC est compris entre 25 et 35 kg/m². Au-delà, la plupart des sujets auront des tours de taille supérieurs aux seuils considérés comme à risque. En clinique, les techniques d'imagerie médicale (scanner, IRM) permettent d'évaluer précisément la répartition des dépôts adipeux et de nombreuses études ont rapporté une association forte entre quantité de graisse abdominale viscérale mesurée par imagerie et marqueurs de risques cardio-métabolique.

I.1.2 Diabète de type 2 et insulino-résistance : deux complications majeures de l'obésité

L'obésité augmente l'incidence de nombreuses pathologies et l'apparition de ces pathologies est influencée par les degrés d'obésité, sa durée et par la répartition du tissu adipeux. Les obésités androïdes présentent davantage de complications que les obésités de type gynoïde (Pi-Sunyer, 2004). Ainsi, L'obésité est un facteur de risque important de développement d'hypertension artérielle et de maladies cardiovasculaires (infarctus, accident vasculaire cérébral, insuffisance veineuse et phlébite), de maladies respiratoires (apnées du sommeil et asthmes), de maladies ostéo-articulaires, de maladies hépatiques (stéatose hépatique non alcoolique), de pancréatite et elle favorise l'apparition ou augmente l'agressivité de certains cancers (sein, colon, prostate, foie, pancréas) (**Figure 1**).

Une des complications fréquente de l'obésité est le diabète de type 2 aussi appelé diabète non insulino-dépendant. 85 % des diabétiques dans le monde souffrent d'un diabète de type 2 qui est une maladie métabolique. L'obésité augmente également le risque chez les femmes de développer un diabète gestationnel, qui survient vers la fin du 2^{ème} trimestre et qui ne peut durer que le temps de la grossesse mais qui est un facteur de risque de développer un diabète de type 2 ultérieurement avec l'âge (Doria et al., 2008 ; Zimmet et al., 2001). D'autres formes de diabètes existent mais ne sont pas associés à l'obésité. Ainsi, environ 10 % des diabétiques souffrent de diabète de type 1 qui est une maladie auto-immune entraînant la destruction des cellules bêta-pancréatiques productrices d'insuline et se déclarant en général chez des gens jeunes. Le traitement est l'injection d'insuline d'où son autre nom de diabète insulino-dépendant. Les diabètes de type MODY (Mature-Onset Diabetes of the Young, MODY1-6) sont des formes rares de diabète. Cliniquement ces formes de diabète sont non insulino-dépendants, au moins pendant les premières années suivant le diagnostic, comme le diabète de type 2 mais ils sont monogéniques et de survenue précoce (classiquement avant l'âge de 25 ans) alors que le diabète de type 2 est une maladie polygénique avec une composante environnementale et apparaissant chez des sujets entre 40 et 50 ans. Les MODY 1, 2, 3, 4, 5 et 6 sont dus respectivement à des mutations des gènes suivants : HNF-4 α (hepatocyte nuclear factor-4 α), Glucokinase, HNF-1 α , IPF-1 (insulin promoter factor-1, également appelé PDX-1), HNF-1 β et NeuroD1 (neurogenic differentiation factor 1, également appelé BETA2) (Vaxillaire et al., 2012). Enfin le diabète néonatal constitue une autre classe de diabètes rares regroupant des formes

monogéniques et des anomalies de l’empreinte parentale entraînant des dysfonctions des cellules bêta-pancréatiques. Le diabète néonatal se caractérise par une carence en insuline circulante qui survient entre la période néonatale et la petite enfance nécessitant un traitement avec de l’insuline qui peut être transitoire ou permanent (Vaxillaire et al., 2012).

Comme mentionné précédemment le diabète de type 2 est la forme la plus répandue des diabètes et l’OMS estime qu’il y a aujourd’hui 320 millions de diabétiques de type 2 dans le monde. En France, environ 6% de la population est touchée par le diabète de type 2 mais ce pourcentage est sans doute plus élevé car beaucoup de diabétiques ne sont pas diagnostiqués.

Cliniquement le diabète de type 2 est défini par :

- une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/l (7,0 mmol/l) et vérifiée à deux reprises. Entre 1.10 et 1.26 g/l, on parle d’hyperglycémie à jeun qui peut être considérée comme un stade de prédiabète.
- ou la présence de symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement) associée à une glycémie supérieure ou égale à 2 g/l (11,1 mmol/l).
- ou une glycémie supérieure ou égale à 2 g/l (11,1 mmol/l) 2 heures après une charge orale de 75 g de glucose (critères proposés par l’OMS).

Le diabète de type 2 provoque des atteintes microvasculaires conduisant au développement de néphropathies (insuffisance rénale), de rétinopathie (cécité), de neuropathies qui perturbent considérablement la sensibilité à la douleur (diminution ou augmentation de la sensation de douleur) ainsi que des atteintes macrovasculaires qui favorisent le développement de complications cardiovasculaires (infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux et artériopathie oblitérante des membres inférieurs). Le diabète et ses complications représentent ainsi la 4^{ème} ou 5^{ème} cause de mortalité dans la plupart des pays développés et environ 3 millions de personnes décèdent chaque année de cette maladie. Ce diabète se déclenche entre 40-50 ans mais avec l’augmentation du nombre d’enfants obèses on assiste à un accroissement des cas de diabète de type 2 chez des gens de plus en plus jeunes (Zimmet et al., 2001).

Le diabète de type 2 résulte de la conjonction d’une résistance à l’action de l’insuline ou insulinorésistance et d’une déficience relative des cellules bêta-pancréatiques à sécréter une quantité adéquate d’insuline pour compenser cette insulinorésistance (Doria et al., 2008).

L'insulinorésistance se définit par une diminution de la capacité des tissus cibles à répondre physiologiquement à l'insuline, principalement les muscles squelettiques, le tissu adipeux, le foie ainsi que le cerveau. Cette insulinorésistance se traduit majoritairement par une diminution de la captation de glucose par les muscles squelettiques et le tissu adipeux, et par une augmentation de la production hépatique de glucose. L'insulinorésistance, outre son implication dans le développement du diabète de type 2, est associée à des modifications du métabolisme glucidique et lipidique et est un élément central du syndrome métabolique anciennement appelé syndrome X ou syndrome d'insulinorésistance (Cornier et al., 2008). Ce syndrome métabolique est diagnostiqué lorsqu'au moins 3 des facteurs de risque suivant sont présents :

- une obésité abdominale, c'est-à-dire un tour de taille >102 cm chez les hommes et > 80 cm chez les femmes.
- Une glycémie à jeun > 1,1 g/l
- Une pression artérielle \geq 140/90 mm Hg
- Un HDL cholestérol < 0,4 g/l chez l'homme et 0,5 g/l chez la femme
- Un niveau de triglycérides circulants > 1,5 g/l

I.1.3 Causes de l'obésité et du diabète de type 2

L'obésité et le diabète de type 2 sont deux pathologies aux origines multiples résultant d'une interaction entre facteurs génétiques de prédispositions et facteurs environnementaux (Farooqi, 2014 ; O'Rahilly and Farooqi, 2006). L'environnement au sens large (comportement alimentaire, mode vie, facteurs auxquels nous sommes exposés) joue un rôle important. Ainsi, l'excès d'apport énergétique par l'alimentation et l'insuffisance des dépenses jouent un rôle incontestable dans l'augmentation de la prévalence de l'obésité. La qualité des aliments (produits riches en acides gras saturés, en fructose ou en glucides simples) est un facteur important à prendre également en compte. Selon sa composition un aliment va déclencher les phénomènes de satiété alors que d'autres non et cela pour une quantité calorique équivalente. Le stress, le sommeil, certains médicaments, des virus, l'exposition à des polluants environnementaux ou à des perturbateurs endocriniens sont vraisemblablement des facteurs potentiellement impliqués dans l'augmentation des cas d'obésité. Plusieurs études récentes ont montré une association entre des modifications de la composition du microbiote intestinal et l'obésité, composition qui serait elle-même

influencée par des facteurs nutritionnels et/ou environnementaux (Backhed et al., 2004 ; Nicholson et al., 2012; Turnbaugh et al., 2006). Les facteurs environnementaux impliqués dans l'augmentation des cas de diabète de type 2 sont souvent les mêmes que ceux impliqués dans le développement de l'obésité.

Si à l'échelle des populations, des modifications de notre mode vie et des modifications de notre environnement expliquent en grande partie l'épidémie d'obésité, à l'échelle d'un individu, la prédisposition génétique joue un rôle important dans le statut pondéral et le risque de développer un diabète de type 2. Cependant, l'impact de ces prédispositions à développer une obésité ou un diabète de type 2 pour un individu donné peut diminuer selon le mode vie de la personne, par exemple en s'astreignant à une activité physique ou en ayant un régime alimentaire équilibré. Ainsi, le diabète de type 2 comme la plupart des formes d'obésités communes sont des maladies polygéniques. Les différentes études d'association pangénomique (GWAS pour Genome-Wide Association Studies) ont permis d'identifier des combinaisons de polymorphismes (SNPs pour Single Nucléotide Polymorphisms) souvent fréquentes (variants fréquents) qui augmentent chez un individu donné le risque de développer ces pathologies (Bell et al., 2005 ; El-Sayed Moustafa and Froguel, 2013). Il faut cependant noter qu'il existe également des formes rares monogéniques d'obésité souvent extrêmes résultant de la mutation d'un seul gène (actuellement 8 gènes ont été impliqués). Ces gènes (leptine et son récepteur, pro-opiomélanocortine, prohormone convertase 1, récepteur 4 aux mélanocortines, brain derived neurotrophic factor et son récepteur et l'homologue du gène Single Minded de la drosophile sont impliqués dans la voie de la leptine-mélanocortine qui est essentielle pour la régulation de la prise alimentaire et du poids (Farooqi and O'Rahilly, 2004).

Dans le cas des obésités communes, les études GWAS ont identifié des variants génétiques fréquents dans des gènes contrôlant la sensation de faim ou de satiété dans le cerveau, le développement ou la localisation du tissu adipeux, l'activité musculaire ou la production d'hormones intestinales contrôlant la prise alimentaire (Bell et al., 2005 ; El-Sayed Moustafa and Froguel, 2013). Concernant le diabète de type 2 les études GWAS ont identifié des variants fréquents dans plusieurs gènes dont la majorité est impliquée dans le contrôle de la fonction ou de la survie des cellules bêta-pancréatiques. Certains de ces variants concernent également des gènes impliqués dans la sensibilité à l'insuline (Basile et al., 2014).

Cependant ces variants fréquents et peu pénétrants n'expliquent qu'une fraction de l'héritabilité du DT2 et de l'obésité (environ 10-15 %). De plus, la très grande majorité de ces variations génétiques se retrouvent dans les parties non codantes des gènes et peu d'études ont été entreprises afin de caractériser leurs effets fonctionnels (Basile et al., 2014). Le développement de nouvelles techniques de séquençage (NGS pour Next Generation Sequencing) devrait permettre de nouvelles avancées dans la dissection de la génétique de l'obésité et du diabète de type 2. Ces techniques permettent d'analyser l'intégralité de l'exome ou du génome et de nombreux groupes les utilisent pour identifier non plus des variants fréquents mais des variants rares (mutation ponctuelles dans les exons ou délétions/duplication génique) à impact biologique fort potentiellement impliqués dans l'obésité et le diabète de type 2.

Enfin au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence que des modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN, méthylation/acétylation/phosphorylation des histones, microARNs) contribuent également à l'obésité et au diabète de type 2 et font le lien entre environnement et régulation de l'expression génique. En particulier, de nombreuses études démontrent que la transmission générationnelle de l'obésité ou du diabète de type 2 pourrait être la conséquence de modifications épigénétiques au cours du développement du fœtus. Ce concept de programmation fœtale de l'obésité et du diabète de type 2 postule que des modifications de l'environnement intra-utérin induit entre autre par l'alimentation de la mère et/ou son statut pondéral (obésité ou malnutrition), va provoquer des changements épigénétiques chez le fœtus affectant son métabolisme et prédisposant par la suite à l'âge adulte au développement de l'obésité et/ou du diabète de type 2 (Bruce, 2014; Schwenk et al., 2013).

I.1.4 Traitements de l'obésité et du diabète

I.1.4.1 Les traitements de l'obésité

Le principal traitement de l'obésité repose sur la réduction de l'excès de poids par un régime associé à une activité physique. Le régime prescrit est le plus souvent hypocalorique mais avec un apport protéinique suffisant afin d'éviter la perte de masse maigre tel que les muscles. Même modéré l'amaigrissement est très souvent bénéfique pour la santé car il s'accompagne généralement d'une réduction de la tension artérielle, du taux de lipides dans

le sang, d'une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline. En cas d'échec des régimes un traitement médicamenteux peut être proposé. De nombreux médicaments utilisés dans le traitement de l'obésité ont été interdits à la vente du fait de leurs effets secondaires. C'est notamment le cas de la famille des fenfluramines dont fait partie le Mediator, utilisés pour leurs effets anorexigènes mais révélant avoir de graves effets secondaires au niveau cardiovasculaire. La Noréphrédine et la Sibutramine agissent aussi comme des agents anorexigènes ou encore le Rimonabant qui est un inhibiteur des récepteurs cannabinoïdes de type I mais qui a été retiré du marché à causes d'un risque augmenté de dépression et/ou de suicide. Actuellement en France il existe peu de médicaments autorisés dans le traitement de l'obésité. C'est le cas de l'Orlistat, un inhibiteur de lipase intestinale qui s'oppose à l'absorption des graisses mais dont l'efficacité est modeste (Baretic, 2013). En cas d'obésité sévère ou morbide des chirurgies bariatriques peuvent être pratiquées. Ces chirurgies peuvent se classer en deux techniques : la pose d'anneau gastrique qui permet de diminuer le volume de l'estomac ou la gastroplastie qui correspond au retrait d'une partie de l'estomac (bypass gastrique et sleeve gastrectomie) (Colquitt et al., 2014).

I.1.4.2 Les traitements du diabète de type 2

Pour le diabète de type 2, la stratégie thérapeutique va consister dans un premier temps en une amélioration des comportements hygiéno-diététiques (augmentation de l'activité physique associée à un rééquilibrage du régime alimentaire) puisque la plupart des patients sont en surpoids ou obèses (Tomkin, 2014). Dans ces recommandations de 2013 concernant le traitement du diabète de type 2 la Haute Autorité de Santé souligne que « *La mise en place de mesures hygiéno-diététiques efficaces est un préalable nécessaire aux traitements médicamenteux du contrôle glycémique et leurs applications doivent être poursuivies tout au long de la prise en charge. Le traitement des autres facteurs de risque cardio-vasculaire et des complications du diabète est par ailleurs essentiel à la prise en charge du patient diabétique* ». L'objectif à atteindre est pour la plupart des patients une valeur d'HbA1c inférieure ou égale à 7 %. Cependant bien souvent la seule stratégie hygiéno-diététique ne suffit pas à atteindre cet objectif et le recours à une stratégie médicamenteuse du contrôle glycémique s'avère nécessaire. Pour cela, il existe différents antidiabétiques, pour la plupart oraux, sauf les analogues du GLP-1 qui sont injectables.

Certains vont agir sur l'insulinorésistance c'est le cas des :

- Biguanides dont le plus utilisé est la Metformine qui ont pour principale action de diminuer la production hépatique de glucose en freinant la néoglucogenèse, ils permettent aussi d'améliorer la sensibilité périphérique à l'insuline. La Metformine est donnée en première intention seule (monothérapie) ou associée à un (bithérapie) ou deux autres (trithérapie) antidiabétiques. Ces médicaments sont relativement bien supportés car ils démontrent peu d'effets secondaires (Pernicova and Korbonits, 2014). De manière intéressante depuis quelques années, la Metformine est aussi étudiée pour ses effets anti-cancéreux (Bost et al., 2012; Pernicova and Korbonits, 2014).
- Glitazones (thiazolidinediones) comme la Rosiglitazone ou la Pioglitazone réduisent la glycémie, l'insulinémie, l'hypertriglycémie et permettent d'améliorer la sensibilité à l'insuline (Yau et al., 2013).Cependant ces molécules ont été retirées du marché en France et/ou en Europe à cause de l'apparition d'insuffisance cardiaque et d'une augmentation du risque d'infarctus ainsi que d'une majoration du risque de cancer de la vessie (Marks, 2013; Tseng, 2014)

D'autres vont agir sur la fonction des cellules bêta-pancréatiques et stimuler la sécrétion d'insuline c'est le cas des :

- Sulfamides hypoglycémisants (Sulfonylurée) et Glinides qui augmentent la sécrétion d'insuline par les cellules bêta-pancréatiques. L'hypoglycémie est l'effet secondaire principal de ces médicaments. Les sulfamides hypoglycémisants sont en général utilisés en bithérapie en association avec la Metformine ou en trithérapie en association avec la Metformine et un autre antidiabétique (ex : Metformine, sulfamide hypoglycémisants et sitagliptine) (Lamos et al., 2013).
- Les analogues du GLP-1 (Glucagon Like peptide-1) tels que l'exénatide et le liraglutide. Le GLP-1 est une incrétine libérée par les cellules entéroendocrines intestinales et qui agit au niveau des cellules bêta-pancréatiques en favorisant la sécrétion d'insuline et réduit la production de glucagon par les cellules alpha-pancréatiques diminuant ainsi la production hépatique de glucose. Il a également un effet positif sur la survie et la croissance des cellules bêta-pancréatiques. Le GLP-1 freine également la vidange gastrique réduisant ainsi l'entrée des nutriments dans la circulation et réduit l'appétit. Cependant sa demi-vie est très courte car il est rapidement dégradé par une protéase la DPP-4 (dipeptidylpeptidase-4). Le GLP-1

natif n'est donc pas utilisé comme traitement du diabète mais les analogues résistants à la dégradation sont désormais sur le marché et démontrent une efficacité certaine pour diminuer la glycémie sans risque d'hypoglycémie et ils entraînent également une perte de poids. Cependant quelques rares cas de pancréatite ont été rapportés. Les recommandations thérapeutiques actuelles conseillent de les utiliser en trithérapie avec la metformine et un autre antidiabétique généralement de la classe des sulfamides hypoglycémiants surtout si les patients ont un IMC supérieur à 30 (Tomkin, 2014).

- Gliptines (vildagliptine, sitagliptine) qui sont des inhibiteurs de la DDP-4, la protéase impliquée dans la dégradation du GLP-1. Ils permettent d'augmenter la demi-vie et de prolonger l'action du GLP-1. Cependant la DPP-4 ne dégrade pas uniquement le GLP-1 et il est donc possible que des effets secondaires apparaissent à long terme. Les recommandations thérapeutiques actuelles sont les mêmes que celles pour les analogues du GLP-1 (Tomkin, 2014).

Enfin d'autres médicaments vont agir au niveau intestinal ou rénal c'est le cas des :

- Inhibiteurs des alpha-glucosidases : Les alpha-glucosidases dégradent les disaccharides en monosaccharides qui peuvent alors franchir la barrière intestinale. Les inhibiteurs des alpha-glucosidases en inhibant la dernière étape de la digestion des sucres vont ralentir leur absorption par l'intestin. L'objectif de l'utilisation de cette classe d'antidiabétique est de diminuer les hyperglycémies postprandiales. L'efficacité de ces molécules est variable et les recommandations thérapeutiques conseillent de les utiliser en général en association avec la metformine et/ou les sulfamides hypoglycémiants. L'effet secondaire majeur est la fermentation des sucres non digérés entraînant des troubles intestinaux (Van de Laar et al., 2005).
- Des inhibiteurs du co-transporteur sodium/glucose de type 2 (SGLT2). Ce co-transporteur est impliqué dans la réabsorption du glucose au niveau des tubules proximaux rénaux. En inhibant ces transporteurs, ces molécules favorisent l'élimination du glucose par l'urine contribuant ainsi à faire baisser la glycémie (Cuypers et al., 2013).

Si ces traitements ne sont pas suffisants pour atteindre l'objectif glycémique fixé une insulinothérapie pourra être envisagée mais constitue toujours un outil thérapeutique de dernier recours.

Le choix de la stratégie thérapeutique (mono, bi, trithérapie) et des types de molécules utilisés dépend de plusieurs paramètres dont l'âge des patients et leur bilan clinico-biologique.

Bien que différents antidiabétiques soient disponibles, toutes ces molécules possèdent leurs limites et leurs effets secondaires surtout dans le cas d'une maladie chronique dont le traitement va être un traitement à vie. Actuellement aucune de ces approches thérapeutiques ne permet de guérir du diabète de type 2. C'est pour cela que la compréhension des mécanismes impliqués dans la mise en place de l'insulinorésistance et du diabète reste un axe de recherche important afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Les différentes études de ces dernières années mettent en évidence que des dysfonctions du tissu adipeux, au fur et à mesure que l'obésité se développe, participent au développement des complications de l'obésité dont l'insulinorésistance et le diabète de type 2. Le développement des complications de l'obésité résulterait donc en partie de la pathologie d'un organe : le tissu adipeux et mieux comprendre les mécanismes de cette dysfonction est donc un enjeu majeur.

I.2 Les tissus adipeux

Il existe trois types de tissus adipeux différenciés par leur localisation, leur structure ainsi que par leurs fonctions : le tissu adipeux brun, le tissu adipeux médullaire et le tissu adipeux blanc.

I.2.1 Le tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun est composé principalement d'adipocytes bruns qui contrairement aux adipocytes du tissu adipeux blanc n'ont pas comme fonction principale le stockage des triglycérides mais l'oxydation des acides gras pour produire de la chaleur. Ce processus de thermogenèse très bien décrit chez les rongeurs est mis en place dans des situations physiologique comme la naissance, l'exposition chronique au froid (thermogenèse non frissonnante) ou en situation postprandiale (thermogenèse induite par l'alimentation). C'est également un mécanisme important pour augmenter la température des mammifères hibernants lors de leur réveil. Le tissu adipeux brun est présent chez les rongeurs tout au long de leur vie ou chez la plupart des mammifères nouveau-nés, humain compris (Cannon

and Nedergaard, 2004). Par contre, jusqu'à ces dernières années l'idée qui prévalait était que le tissu adipeux brun régressait avec l'âge et qu'il était peu abondant voir absent chez les mammifères de grande taille, humain y compris. Cependant de récentes études ont remis en question ce dogme avec la démonstration de l'existence de tissu adipeux brun fonctionnel chez l'homme adulte (Chechi et al., 2014). Chez les rongeurs les dépôts de tissu adipeux sont localisés principalement dans les régions interscapulaires, péri-aortiques, péricardiques, périrénales. Chez l'homme des dépôts de tissu adipeux brun ont été identifiés notamment dans la région couvrant la partie antérieure du cou jusqu'au thorax. Sa présence est inversement corrélée à l'IMC, suggérant un rôle de ce tissu dans le métabolisme chez l'adulte (Chechi et al., 2014 ; Cypess et al., 2009). Chez les rongeurs et possiblement chez l'homme on trouve également des adipocytes bruns dans les dépôts de tissu adipeux blanc. Ces adipocytes ont été nommés adipocytes beige ou brit (brown-in-white) et leur quantité est augmentée en réponse à des stimuli thermogéniques (Giralt and Villarroya, 2013).

Les adipocytes bruns ont un cytoplasme contenant des gouttelettes lipidiques nombreuses et de petite taille. Le tissu adipeux brun est très innervé et vascularisé. L'innervation est de type sympathique produisant de la noradrenaline qui est un activateur puissant de la thermogénèse. Les propriétés thermogéniques des adipocytes bruns sont conférées par la présence au sein de la membrane interne des mitochondries d'une protéine appelée thermogénine ou UCP-1 (Uncoupling Protein 1) (Nedergaard et al., 2005; Ricquier, 2005). Cette protéine est responsable du découplage de la respiration des mitochondries, c'est-à-dire que les mitochondries des adipocytes bruns sont capables d'oxyder rapidement les coenzymes mais en proportion synthétisent peu d'ATP. Ainsi, l'énergie de ces oxydations est « gaspillée » sous forme de chaleur. Le mécanisme sous-jacent à ce découplage réside dans la structure d'UCP-1 qui est un canal à proton. Habituellement dans les mitochondries de tous les tissus, les complexes de la chaîne respiratoire génèrent un gradient de proton entre l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondrial. L'énergie de ce gradient de protons est utilisée par l'ATP synthase pour synthétiser l'ATP. L'UCP-1 présente spécifiquement dans les mitochondries des adipocytes bruns détourne le circuit de proton de l'ATP synthase et l'énergie du gradient n'étant plus utilisée pour synthétiser de l'ATP, est dissipée sous forme de chaleur (Nedergaard et al., 2005 ; Ricquier, 2005).

L'étude des adipocytes bruns, qu'ils soient localisés dans des dépôts bien identifiés ou au sein du tissu adipeux blanc, connaît un regain d'intérêt suscité par la mise en évidence

d'adipocytes bruns chez l'homme. Les études actuelles visent à mieux comprendre les mécanismes de leur formation pour stimuler la production de ces cellules capables d'oxyder les acides gras avec comme espoir de favoriser la perte de poids et/ou d'améliorer les complications de l'obésité (Chechi et al., 2014).

I.2.2 Le tissu adipeux médullaire

Le tissu adipeux médullaire n'est pas un tissu au même titre que les tissus adipeux brun et blanc. Il serait plus approprié de parler d'adipocytes médullaires. En effet, de nombreux adipocytes sont présents au sein même de la moelle osseuse et font partie du stroma-médullaire qui est le support de l'hématopoïèse. Les adipocytes médullaires sont uniloculaires et sont à la fois source d'énergie, de facteurs de croissance, de cytokines et de produits lipidiques qui participent au processus hématopoïétique (Hardouin et al., 2014). Récemment, il a été montré que le tissu adipeux médullaire augmente au cours de la restriction calorique et qu'il contribue à l'augmentation d'adiponectine circulante au cours de cette restriction (Cawthorn et al., 2014).

I.2.3 Le tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est le plus abondant chez l'Homme adulte, il représente 15 à 25 % du poids d'un individu. Il est la plus importante réserve énergétique de l'organisme, et son rôle essentiel est d'assurer le maintien de l'équilibre énergétique. Il existe différentes localisations de tissu adipeux blanc, le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux viscéral, ce dernier étant décrit pour avoir une implication plus importante dans le développement de l'insulinorésistance (Hauner, 2004).

I.2.3.1 Composition et structure

Le tissu adipeux blanc est un tissu conjonctif hétérogène constitué de plusieurs types cellulaires : les adipocytes, les cellules du stroma et des vaisseaux (fraction stroma-vasculaire) et d'une matrice extracellulaire composée de protéines d'adhésion et de structure. Généralement on dissocie ce tissu en deux fractions : la fraction adipocytaire et la fraction stroma-vasculaire.

Les adipocytes représentent un à deux tiers du nombre total de cellules. Ce sont des cellules dont le diamètre se situe entre 70 à 100µm. Elles contiennent une unique vacuole lipidique, contenant les triglycérides, qui occupe la presque totalité du cytoplasme. Les adipocytes sont regroupés en lobules séparés par un fin réseau de fibres de réticuline où passent les capillaires et les terminaisons nerveuses. Lors de l'obésité, ce tissu adipeux est remodelé et on observe une hyperplasie et une hypertrophie des adipocytes. L'hyperplasie correspond à l'augmentation du nombre d'adipocytes, elle nécessite des précurseurs que sont les pré-adipocytes ainsi que des cellules souches présents au sein de ce tissu adipeux. L'hypertrophie correspond à l'augmentation de la taille des adipocytes, due à un déséquilibre entre stockage et utilisation des triglycérides, ces adipocytes peuvent atteindre des tailles proches de 200 µm. Ces adipocytes hypertrophiés présentent des dysfonctions métaboliques et endocrines et participent ainsi au développement des complications associées à l'obésité, notamment l'insulinorésistance (de Ferranti and Mozaffarian, 2008). La fraction stroma-vasculaire contient les pré-adipocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires. Lors de l'obésité l'hyperplasie et l'hypertrophie du tissu adipeux s'accompagne d'une augmentation de l'infiltration de ces cellules immunitaires.

I.2.3.2 Fonctions du tissu adipeux

Le tissu adipeux joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie énergétique par sa fonction de stockage des acides gras sous forme de triglycérides et leur libération en fonction des besoins énergétiques ainsi que par sa fonction endocrine. Au sein du tissu adipeux, les adipocytes assurent les fonctions de stockage alors que la fonction endocrine implique les adipocytes et les cellules non adipocytaires de la fraction stroma-vasculaire.

Dans les adipocytes, les acides gras sont stockés sous forme de triglycérides qui sont constitués d'une molécule de glycérol sur laquelle trois molécules d'acides gras sont estérifiées. Les adipocytes sont les seules cellules de l'organisme spécialisées dans le stockage des triglycérides. Ces triglycérides constituent une réserve énergétique importante pour l'organisme et une forme chimiquement neutre des acides gras, non toxique pour les cellules. Cette fonction de stockage est donc importante non seulement pour le contrôle de l'homéostasie énergétique mais également pour éviter que les acides gras ne soient redistribués dans d'autres cellules de l'organisme où ils auraient des effets toxiques. Lors de

l'obésité, la capacité de stockage maximale des adipocytes peut être dépassée entraînant une redistribution des acides gras dans d'autres tissus tels que le foie ou les muscles. Ces acides gras et/ou leurs métabolites vont contribuer dans ces tissus aux altérations de la signalisation et de l'action de l'insuline (Virtue and Vidal-Puig, 2010). Ce phénomène appelé lipotoxicité participe au développement de l'insulinorésistance (**figure 2**).

Les acides gras stockés sous forme de triglycérides proviennent pour une part importante de l'alimentation. Les triglycérides, après leur hydrolyse intestinale et leur resynthèse dans les entérocytes sont sécrétés dans le système lymphatique sous forme de chylomicrons qui entrent ensuite dans la circulation (Miles and Nelson, 2007). Les chylomicrons sont des lipoprotéines composées d'un cœur de triglycérides et d'ester de cholestérol entouré par une membrane composée de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines principalement l'apoB48. Dans le sang les chylomicrons acquièrent l'apoC2 et l'apoE par échange protéique avec les HDL (High Density Lipoprotein). Les acides gras stockés dans les adipocytes peuvent également provenir d'une lipogenèse *de novo* à partir du glucose dans le foie qui va par la suite les sécréter sous forme de VLDL (Very Low Density Lipoprotein), une autre classe de lipoprotéines riche en apoB100, ApoC2 et ApoE (Miles and Nelson, 2007).

Les triglycérides contenus dans Les chylomicrons et les VLDL n'entrent pas directement en tant que tel dans les adipocytes car ces lipoprotéines ne peuvent franchir l'endothélium des vaisseaux sanguin du tissu adipeux. Les triglycérides, au sein des chylomicrons ou des VLDL, sont d'abord hydrolysés en acides gras et 2-monoglycerol par la lipoprotéine lipase (LPL) qui est synthétisée par les adipocytes puis exportée et ancrée à la membrane de l'endothélium vasculaire. L'insuline augmente l'ARNm de la LPL ainsi que l'activité et la sécrétion de la protéine en période postprandiale favorisant ainsi la formation d'acides gras qui vont entrer dans les adipocytes (Wang and Eckel, 2009). Cette entrée d'acides gras se fait par un transport saturable qui fait intervenir différentes protéines (FATP : fatty acid transporter protein, CD36 , FABPm : fatty acid binding protein of the plasma membrane). Les acides gras se lient ensuite dans le cytoplasme à différents protéines de la famille des FABP (Fatty Acid Binding Protein) et sont ensuite transformés en acyl-CoA par une Acyl-CoA synthase (isoforme 1) qui servent de précurseurs pour la synthèse des triglycérides dans une série de réactions décrite dans la **figure 3** (Hajri and Abumrad, 2002).

Comme dans le foie, les acides gras dans l'adipocyte peuvent être également synthétisés *de novo* à partir du glucose lorsque l'apport en glucide est important. Les triglycérides seront

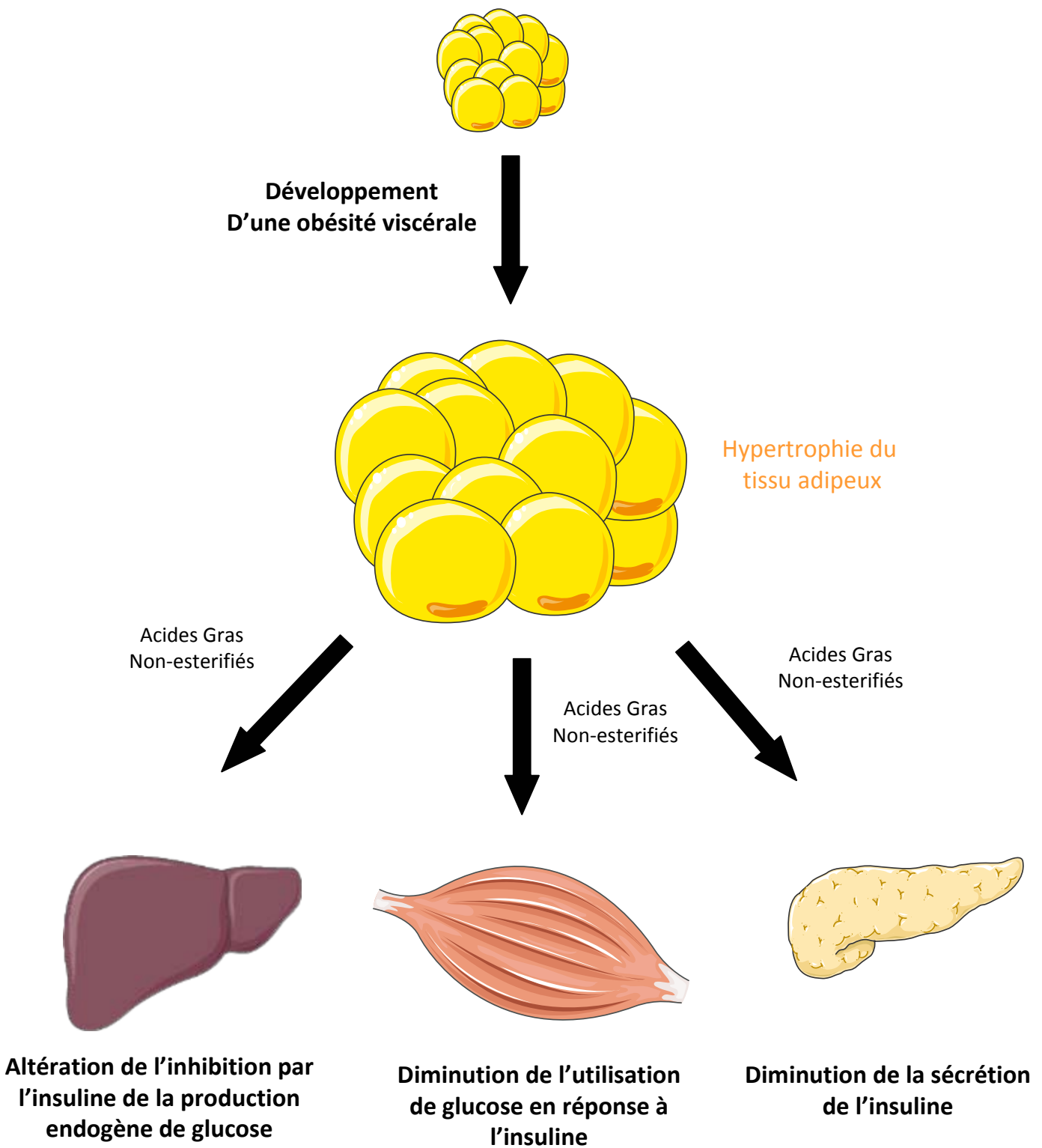


Figure 2 : Le concept de lipotoxicité du tissu adipeux

L'hypertrophie et la dysfonction du tissu adipeux participe à l'augmentation des taux circulants d'acides gras non-esterifiés (AGNE). L'augmentation d'AGNE va participer à la dérégulation notamment sur l'action de l'insuline au niveau de certains organes tels que le foie, les muscles squelettiques et le pancréas.

ensuite synthétisés à partir de ces acides gras néoformés. La contribution de la lipogenèse *de novo* dans l'accumulation de triglycérides dans l'adipocyte humain est plus faible que chez les rongeurs et diminue chez les patients obèses (Diraison et al., 2002 ; Minehira et al., 2004). Les travaux de Keith Frayn suggèrent qu'en condition physiologique, la lipogenèse *de novo* chez l'homme se produit essentiellement dans les petits adipocytes et pourrait être un phénomène initiateur de l'accumulation de triglycérides qui laisserait place au captage d'acides gras exogènes lorsque l'adipocyte grossit. Cette étude suggère également que la lipogenèse *de novo* adipocytaire est corrélée positivement avec l'insuline-sensibilité (Roberts et al., 2009). Une augmentation de la lipogenèse *de novo* hépatique associée avec une amélioration de la sensibilité à l'insuline a été également décrite (Benhamed et al., 2012). Il a été montré que la nature des acides gras (longueur de chaîne, saturation etc....) et pas seulement leur quantité impactent sur la sensibilité à l'insuline. Il est donc possible que les acides gras issus de la lipogenèse *de novo* aient un effet délétère moindre sur la sensibilité à l'insuline par rapport aux acides gras alimentaires, en particulier lorsque ces derniers proviennent d'une alimentation riche en graisses saturées.

L'insuline joue un rôle important dans la régulation de la lipogenèse *de novo* en contrôlant l'expression d'enzymes clés de cette voie métabolique souvent en synergie avec le glucose (Czech et al., 2013). L'insuline stimule également le transport du glucose dans les adipocytes par des mécanismes qui seront décrits dans le prochain chapitre. Ce glucose sera utilisé pour la synthèse des acides gras mais également pour fournir du glycérol-3 phosphate dans la première étape de la synthèse des triglycérides à partir des acides gras. Enfin, les travaux du groupe de Barbara Kahn ont montré que des perturbations du flux de glucose dans les adipocytes modifient leurs fonctions endocrines favorisant ainsi le développement de l'insulinorésistance (Abel et al., 2001). Ainsi, bien que le site principal d'utilisation du glucose soit les muscles, l'augmentation du transport de glucose induit par l'insuline dans les adipocytes joue un rôle important dans la biologie des adipocytes et est altéré dans le tissu adipeux d'obèses insuline-résistants.

Les triglycérides stockés dans les adipocytes vont être hydrolysés par un processus de lipolyse pour redonner des acides gras en cas de carence énergétique (jeune, effort prolongés par exemple). Une grande partie de ces acides gras va être libérée par les adipocytes et servira de sources d'énergie alternative au glucose pour les organes oxydatifs (muscles, cœur, foie, cerveau, rein) et une partie sera ré-estérifiée dans les adipocytes

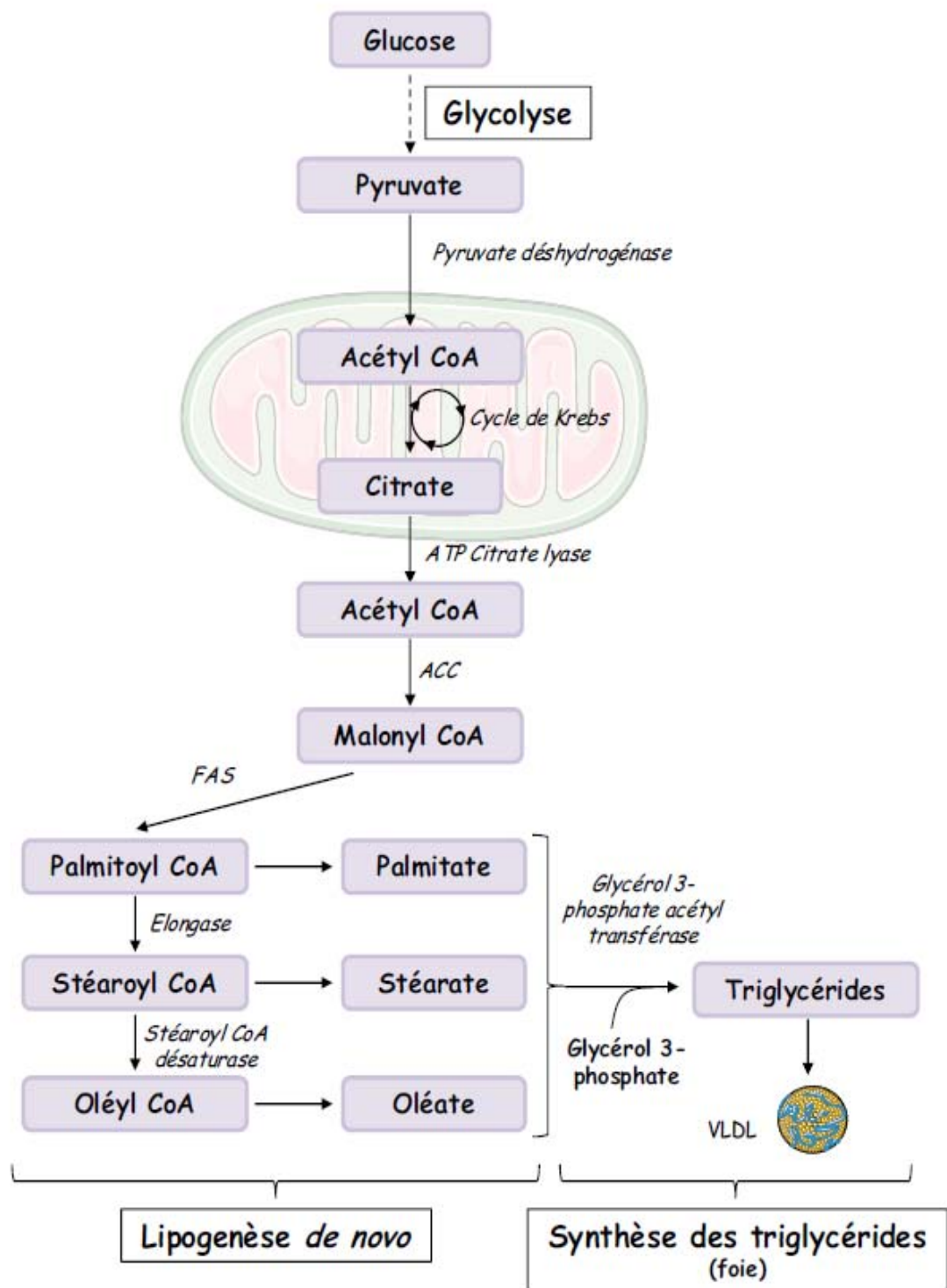


Figure 3 : Voie de la lipogénèse *de novo*

La lipogénèse *de novo* transforme le glucose en acides gras qui pourront ensuite être transformés en triglycérides dans le foie et exportés sous forme de VLDL

(Kolditz and Langin, 2010). La lipolyse est un processus séquentiel au cours duquel les triglycérides sont hydrolysés en diacylglycerol puis en monoacylglycérol et enfin en glycérol, libérant alors une molécule d'acide gras à chaque étape. Différentes lipases interviennent au cours de ces étapes. L'adipose triglycéride lipase (ATGL) catalyse la conversion des triglycérides en diacylglycérol et joue un rôle pivot dans la lipolyse de base et dans la lipolyse stimulée. Elle est associée aux gouttelettes lipidiques *via* son extrémité C-terminale. L'activité de l'ATGL est contrôlée positivement par la protéine ABHD5 appelée également CGI-58 et négativement par la protéine G0S2 (G0/G1 switch gene 2). En condition de lipolyse faible, ABHD5/CGI-58 est associé avec la périlipine au niveau des gouttelettes lipidiques et G0S2 interagit avec ATGL inhibant son activité enzymatique. Les facteurs stimulant la lipolyse entraînent une dissociation d'ABHD5/CGI-58 de la périlipine et son association avec ATGL. La lipase hormono-sensible (LHS) catalyse la transformation des diacylglycerols en 2-monoacylglycérol. Les stimuli lipolytiques activent la LHS en augmentant sa sérine phosphorylation principalement *via* l'activation de la PKA et de la PKG et en favorisant sa translocation du cytosol vers la surface de la gouttelette lipidique. Enfin la Monoglycéride Lipase (MGL) catalyse l'hydrolyse finale des 2-monoacylglycerol (Kolditz and Langin, 2010).

La lipolyse est un processus finement contrôlé par différents stimuli hormonaux activateurs ou inhibiteurs ainsi que par les fibres nerveuses et sensorielles qui innervent le tissu adipeux. Les catécholamines augmentent la lipolyse *via* leur interaction avec les récepteurs β_1/β_2 adrénergiques ainsi que β_3 (chez les rongeurs uniquement) entraînant ainsi une augmentation de la production d'AMPc et l'activation de la PKA. Les peptides natriurétiques (ANP : Atrial Natriuretic Peptide et BNP : Brain Natriuretic Peptide) augmentent la lipolyse *via* le GMPc et l'activation de la PKG. Les PKA/G comme mentionné précédemment activent la LHS par phosphorylation et phosphorylent également la périlipine favorisant ainsi l'hydrolyse des triglycérides (Kolditz and Langin, 2010). Certains stimuli inflammatoires en particulier le TNF- α sont capables d'augmenter la lipolyse de base principalement en altérant l'expression des périlipines favorisant ainsi l'hydrolyse des triglycérides (Ryden et al., 2004; Souza et al., 2003).

Les catécholamines en particulier la noradrénaline et l'adrénaline peuvent cependant aussi inhiber la lipolyse *via* leur interaction avec les récepteurs α_2 -adrénergiques couplés aux protéines Gi qui inhibent l'adénylate cyclase et réduisent les taux d'AMPc. Ainsi, l'effet des catécholamines sur la lipolyse dépendra de leurs affinités relatives pour les récepteurs

β versus $\alpha 2$ adrénergiques et du ratio entre ces deux types de récepteurs. De nombreux autres ligands, dont les récepteurs, sont couplés aux protéines G_i régulent négativement la lipolyse (Lafontan and Langin, 2009).

L'insuline est également une hormone antilipolytique dont l'effet passe par l'activation de la phosphodiesterase 3B par des événements de phosphorylation entraînant ainsi une baisse des taux d'AMPc (Lafontan and Langin, 2009). Une résistance des adipocytes à l'effet antilipolytique ainsi que la dysfonction des lipases, des récepteurs lipo- et antilipolitiques, la présence de cytokines inflammatoires dans le tissu adipeux obèse sont autant de facteurs qui contribuent à perturber la biologie des adipocytes et au développement des complications de l'obésité.

Pendant de nombreuses années, le tissu adipeux blanc a été considéré comme un organe uniquement impliqué dans le métabolisme des lipides, permettant le stockage et la libération des acides gras (Hauner, 2004). La découverte de la leptine et la démonstration de sa sécrétion par le tissu adipeux par le groupe de Friedman en 1994 (Zhang et al., 1994) a révolutionné la vision de la fonction du tissu adipeux. Ce tissu est désormais considéré comme un organe endocrine à part entière sécrétant de nombreuses protéines collectivement appelées adipokines (McGown et al., 2014).

Initialement le terme adipokine était utilisé pour définir les protéines spécifiquement sécrétées par les adipocytes mais actuellement ce terme désigne l'ensemble des facteurs sécrétés par le tissu adipeux (adipocytes et cellules de la fraction stroma-vasculaire). En conséquence, certains de ces facteurs appelés adipokine peuvent également être sécrétés par d'autres tissus ou cellules en dehors du tissu adipeux. Ainsi, ce terme englobe à l'heure actuelle une grande variété de facteurs (plus de 300 facteurs identifiés à ce jour) qui contrôlent de nombreux processus biologiques. Ces adipokines agissent de manières paracrines, autocrines et endocrines, et jouent d'importants rôles dans la régulation de nombreux processus biologiques (McGown et al., 2014). L'action endocrine des adipokines est fondamentale dans la communication entre le tissu adipeux et les autres organes comme par exemple le foie, le cerveau, les muscles, le pancréas. Cette communication inter-organes est essentielle au maintien de l'homéostasie énergétique et gluco-lipidique. La fonction endocrine du tissu adipeux est fortement altérée dans l'obésité contribuant au

développement des complications de l'obésité dont l'insulinorésistance et le diabète de type 2 (Cao, 2014).

Nous nous attacherons à décrire brièvement et de manière non exhaustive l'implication de certaines de ces adipokines dans la régulation l'homéostasie énergétique, la sensibilité à l'insuline et l'inflammation. C'est le cas de la leptine, qui en se fixant sur des récepteurs hypothalamiques, inhibe la prise alimentaire permettant ainsi de réguler la masse corporelle. Le taux circulant de cette hormone, agirait comme un "adipostat" signalant au système nerveux central l'état des réserves énergétiques lipidiques de l'organisme et modulant le comportement alimentaire en fonction de celles-ci. Chez les obèses les taux circulants de leptine sont élevés mais on observe une résistance à son action au niveau hypothalamique (Park and Ahima, 2014). L'adiponectine par son action améliore la sensibilité en l'insuline en agissant sur le foie et les muscles et à des effets anti-inflammatoires. Les taux circulants d'adiponectine sont réduits lors de l'obésité et des études récentes suggèrent que des agonistes des récepteurs de l'adiponectine pourraient avoir un effet thérapeutique sur le diabète de type 2 (Okada-Iwabu et al., 2013; Padmalayam and Suto, 2013). L'apeline a un effet bénéfique sur le métabolisme glucidique en particulier en agissant sur les muscles pour stimuler la biogenèse mitochondriale. L'apeline pourrait également avoir un effet bénéfique *via* une action au niveau de l'hypothalamus. Des études récentes démontrent que le traitement de souris obèses avec de l'apeline permet d'améliorer l'insulinorésistance et de diminuer la masse grasse suggérant que cette adipokine pourrait être utilisée en thérapeutique chez l'homme (Attane et al., 2012; Castan-Laurell et al., 2005; Castan-Laurell et al., 2011; Castan-Laurell et al., 2012; Dray et al., 2008). La vaspine (visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor) est principalement exprimée par le tissu adipeux viscéral et son injection au niveau cérébrale à des souris obèses améliore la sensibilité à l'insuline et réduit la prise alimentaire (Blüher, 2012 ; Kloting et al., 2011). L'omentine est elle aussi préférentiellement exprimé dans le tissu adipeux viscéral, plus précisément par les cellules stromales, mais on en retrouve également dans le tissu adipeux sous-cutané ou elle potentialise l'action de l'insuline. L'omentine exerce également des effets anti-inflammatoires *via* l'inhibition de NF- κ B (Jaikanth et al., 2013). D'autres adipokines comme RBP4 (Retinol Binding Protein 4), la resistine, la visfatine, la chemerine ou le PAI-1 vont avoir des effets délétères sur la sensibilité à l'insuline lorsqu'elles sont sécrétées en excès par le tissu adipeux obèse. Le tissu adipeux est également capable

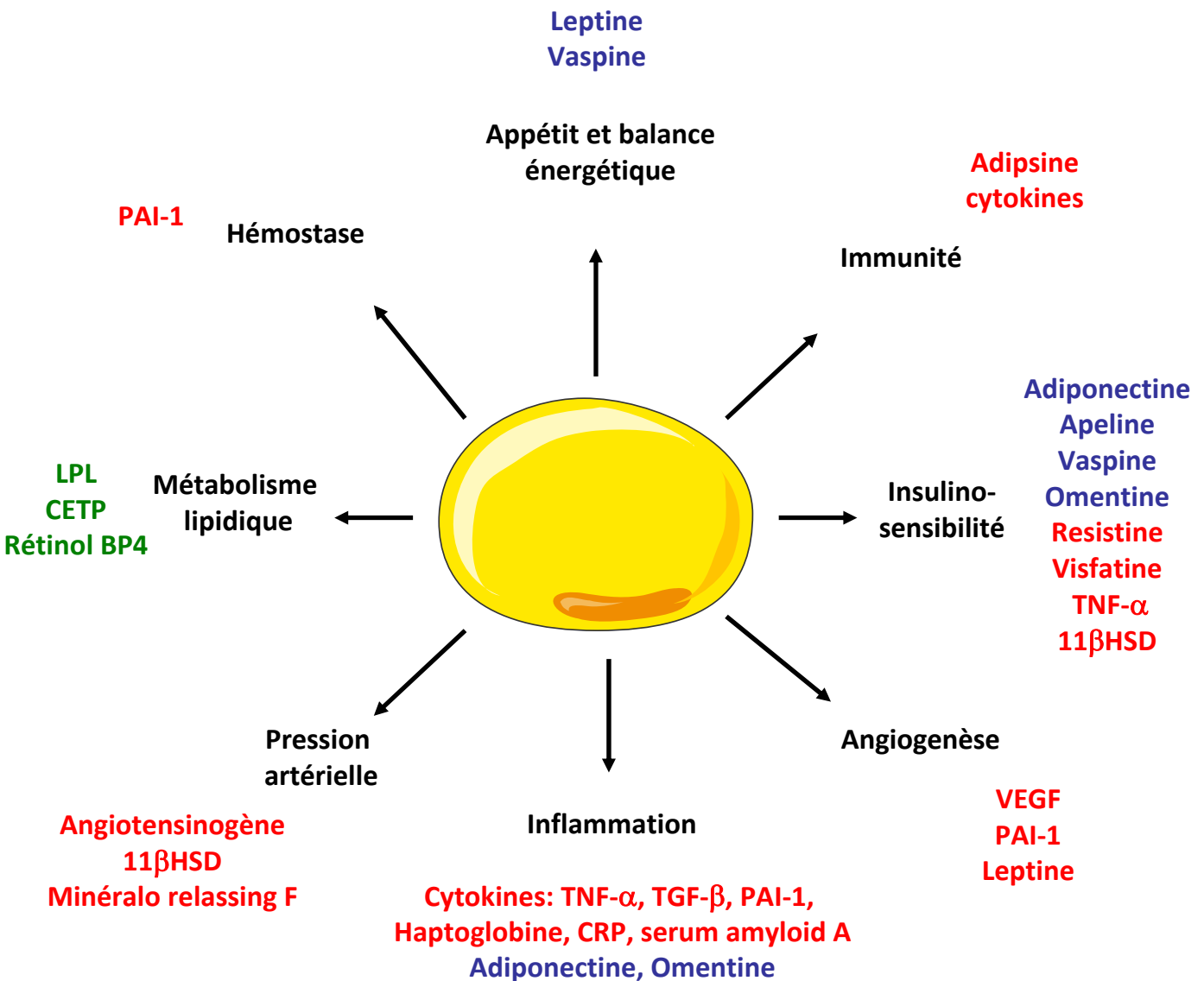


Figure 4 : Les adipokines associées aux fonctions métaboliques du tissu adipeux (d'après Trayhum 2004)

Le tissu adipeux possède une fonction endocrine au travers de la sécrétion de nombreux facteurs appelés adipokines. La grande diversité de ces adipokines les implique dans des nombreux processus biologiques.

de produire différentes cytokines inflammatoires telles que des interleukines pro- ou anti-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, IL-10 et IL-1R antagoniste) du TNF α et différentes chimiokines (CXCL-10, MCP-1 (CCL2), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13), Rantes (CCL5), l'ostéopontine) (Galic et al., 2010; Trayhurn and Wood, 2004)(Figure 4).

Comme évoqué précédemment le tissu adipeux blanc se retrouve dans différentes localisations tel que les dépôts sous-cutané et viscéral. Les modifications d'expression et de sécrétion des adipokines lors de l'obésité font partie des caractéristiques différenciant ces deux tissus. Par exemple : La leptine est préférentiellement sécrétée par le tissu adipeux sous-cutané alors que l'expression de l'adiponectine, PAI-1, IL-8 et l'IL-1 β et généralement des cytokines pro-inflammatoires est plus importante dans le tissu adipeux viscéral. Ces différences entre ces deux dépôts en terme de sécrétions et de productions d'adipokines interviennent certainement dans les divergences observées dans le développement des complications métaboliques qui leur sont associés.

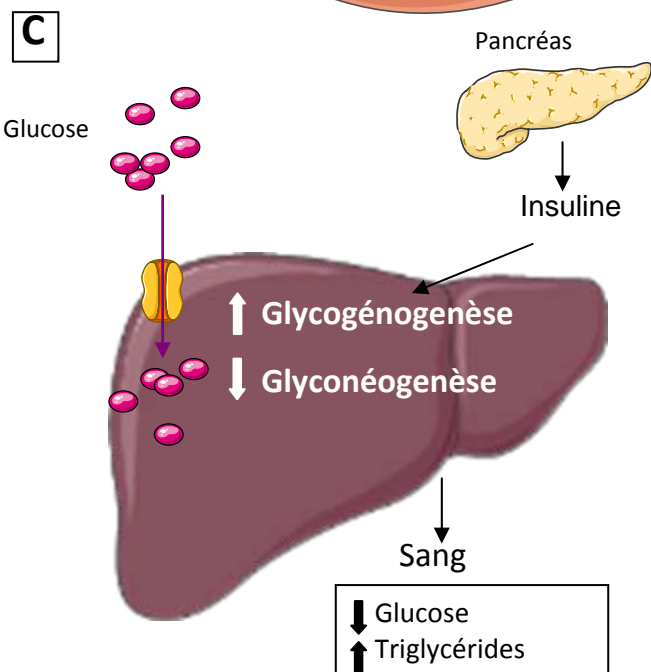
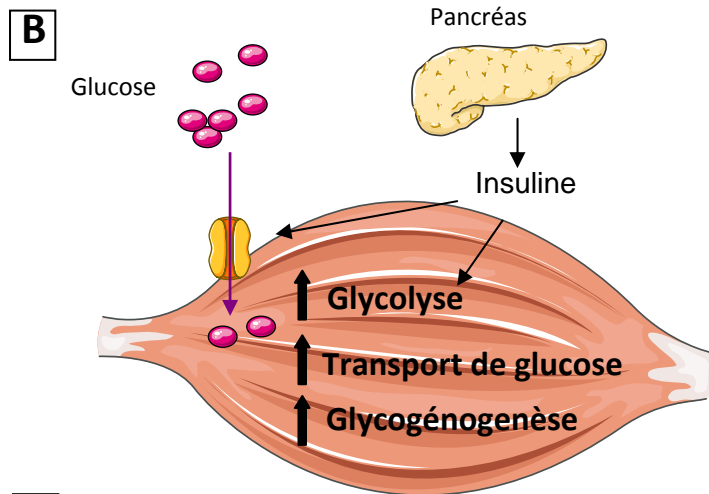
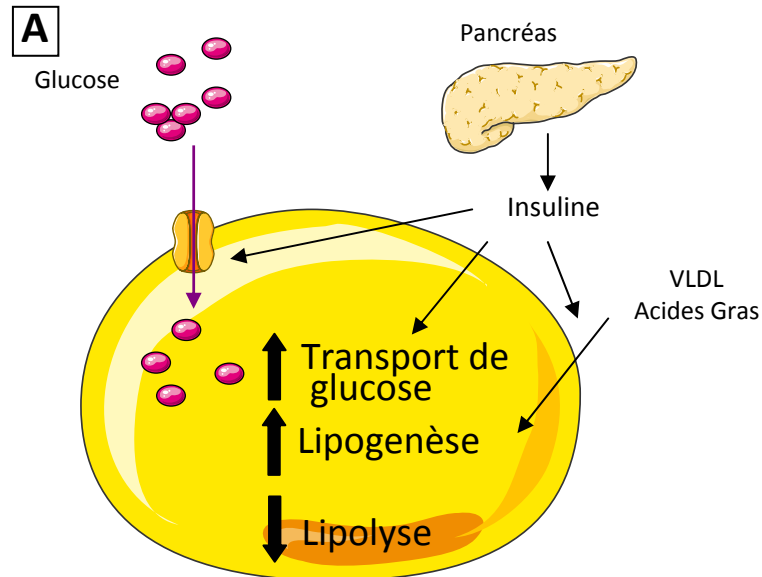
L'augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans les tissus adipeux est une caractéristique de l'obésité signant un état inflammatoire de ces tissus. Il apparaît désormais que cet état inflammatoire contribue au développement et/ou au maintien de l'insulinorésistance et que les cytokines inflammatoires jouent un rôle important dans le développement des altérations de la signalisation insulinaire. Dans les chapitres suivants, après avoir décrit les mécanismes de la signalisation insulinaire, nous décrirons les causes et les médiateurs cellulaires de l'inflammation du tissu adipeux ainsi que les voies de signalisation utilisées par les cytokines inflammatoires pour inhiber l'action de l'insuline.

I.3 Rôle et signalisation de l'insuline

I.3.1 Rôle physiologique de l'insuline

L'insuline est une hormone polypeptidique synthétisée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. L'insuline est stockée dans les cellules β , elle est sécrétée par exocytose notamment suite à une augmentation de la concentration en glucose dans la circulation sanguine (Biddinger and Kahn, 2006). L'insuline est une hormone hypoglycémisante jouant un rôle crucial dans la régulation énergétique de l'organisme.

A l'état nourri



A jeun

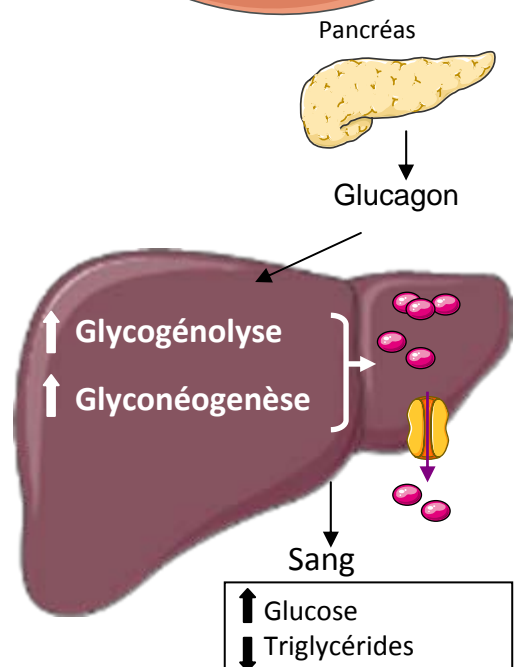
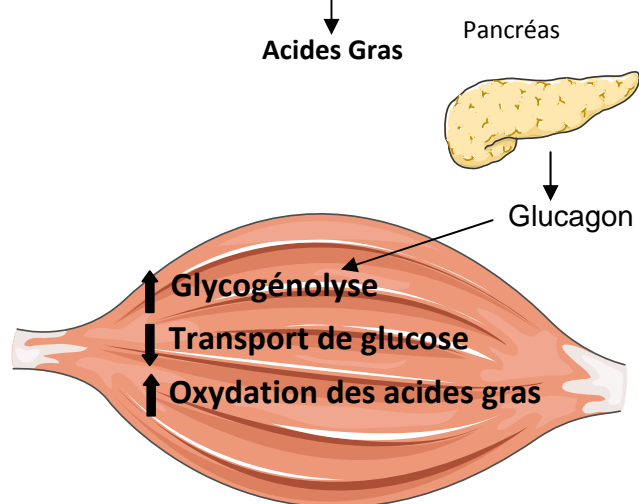
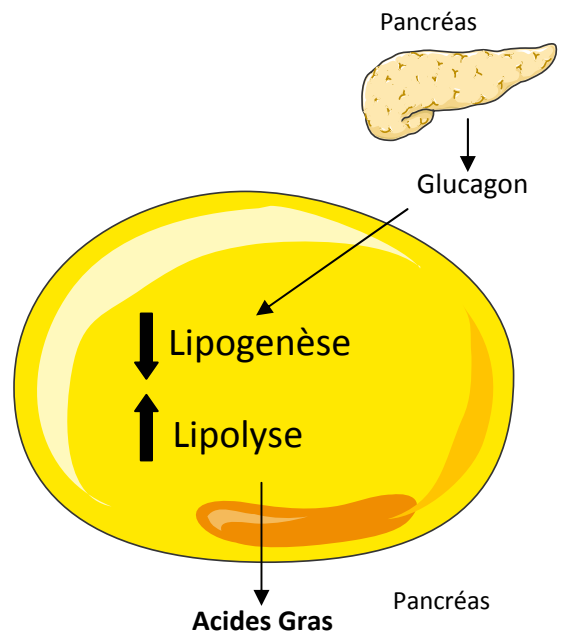


Figure 5: Rôle des organes cibles de l'insuline dans le métabolisme énergétique

Lors d'un apport alimentaire le pancréas sécrète l'insuline afin de diminuer la glycémie au travers de la capatation et du stockage du glucose dans les différents organes cibles de l'insuline. Lors d'un jeûne le pancréas sécrète le glucagon qui va permettre de maintenir la glycémie en augmentant la libération du glucose par le tissu adipeux, les muscles et le foie.

L'insuline a pour principale fonction de diminuer le taux de glucose dans le sang. Elle exerce majoritairement son action sur le foie, le muscle et le tissu adipeux (**figure 5**).

En se fixant sur les hépatocytes l'insuline active la glycogénogenèse et inhibe la néoglucogenèse (Klover and Mooney, 2004). L'insuline permet donc le stockage du glucose dans le foie et diminue la glycémie sanguine. Le foie étant un organe majeur pour la lipogenèse, lors d'un excès de glucose et lorsque les réserves de glycogène sont suffisantes, l'insuline favorise la transformation du glucose en acides gras.

Dans les cellules musculaires, l'insuline stimule l'entrée du glucose qui sera, comme pour le foie, stocké sous forme de glycogène. En plus de ce rôle dans le métabolisme glucidique, l'insuline augmente la synthèse protéique et l'incorporation des acides gras (Dimitriadis et al., 2011).

Au niveau du tissu adipeux l'insuline va agir principalement au niveau des adipocytes en permettant l'entrée du glucose qui sera transformé en acides gras lors de la lipogenèse *de novo*. Les adipocytes sont les seules cellules spécialement adaptées pour stocker des lipides sans altérer leur bon fonctionnement. Avec un équilibre entre les mécanismes de lipogenèse et de lipolyse. Les adipocytes ont une activité lipogénique importante, cependant son importance varie entre les espèces. Chez l'homme, c'est majoritairement le foie qui effectue cette réaction alors que chez la souris, la lipogenèse s'effectue aussi bien dans le foie que dans le tissu adipeux. Les adipocytes captent également les VLDL libérés par le foie. Afin de pénétrer dans l'adipocyte, les triglycérides sont hydrolysés en acides gras, puis de nouveau estérifiés en triglycérides à l'intérieur de la cellule. Les acides gras libres issus de l'alimentation sont également captés et estérifiés suivant le même processus. L'insuline favorise ce stockage en activant la voie de la lipogenèse et en inhibant la lipolyse (Lafontan and Langin, 2009; Large et al., 2004).

I.3.2 La voie de signalisation de l'insuline

Après sa fixation sur son récepteur, présent à la membrane plasmique cellulaire, l'insuline va induire une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant aux effets métaboliques qui lui sont propres, tel que l'augmentation du transport de glucose et la lipogenèse (**figure 6**).

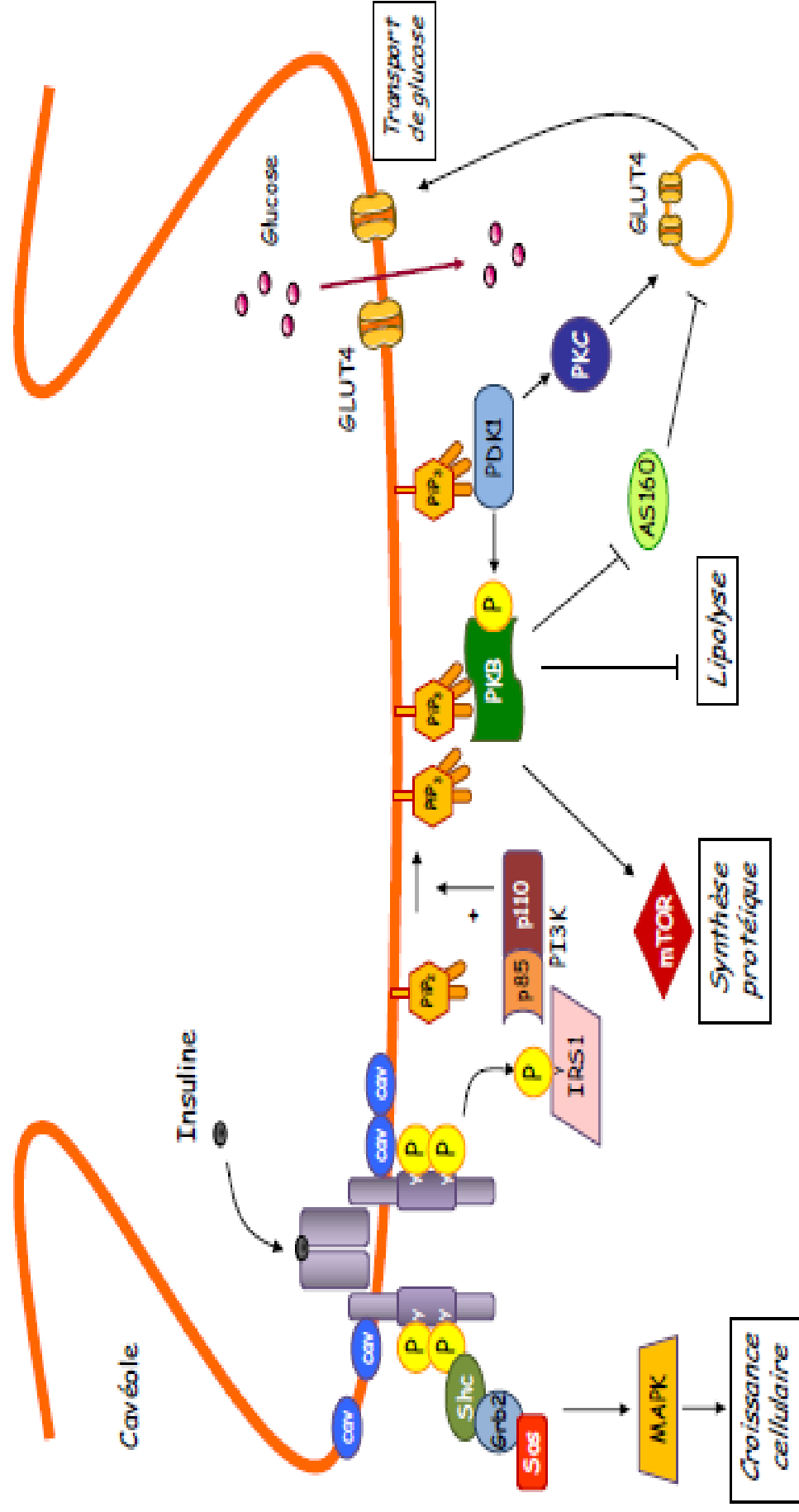


Figure 6 : Voie de signalisation de l'insuline dans l'adipocyte

I.3.2.1 Le récepteur de l'insuline

Le récepteur de l'insuline (IR) est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase localisé à la membrane plasmique dans des invaginations appelées cavéoles (Foti et al., 2007). Il est présent dans tous les types cellulaires, mais on le retrouve majoritairement dans les organes sensibles à l'insuline comme le tissu adipeux, le foie ou le muscle ainsi que dans le cerveau et les cellules β du pancréas. Il s'agit d'un hétérotétramère composé de deux sous-unités α extracellulaires, et de deux sous-unités β transmembranaires associées par des ponts disulfures. La liaison de l'insuline aux sous-unités α entraîne un changement de conformation du récepteur qui augmente l'activité des sous-unités β qui s'autophosphorylent sur des résidus tyrosine, ces phosphorylations permettent de réguler les fonction enzymatiques du récepteur (Wilden et al., 1992).

Les sous-unités β sont composées de trois régions :

- Le domaine juxtamembranaire : la phosphorylation du résidu Tyr⁹⁶⁰, situé dans cette région est essentielle à la liaison du domaine PTB (Phospho Tyrosine Binding) des substrats du récepteur de l'insuline IRS (Insulin Receptor Substrat). Une mutation au niveau de ce résidu n'affecte pas l'activité du récepteur mais inhibe l'association avec les substrats et donc la réponse métabolique.

- Le domaine kinase : la phosphorylation des résidus Tyr^{1146, 1150 et 1151}, situés dans la boucle régulatrice, permet de moduler l'activité tyrosine kinase du récepteur. En effet, leur phosphorylation induit un changement de conformation du récepteur laissant libre accès à l'ATP (Youngren, 2007).

- Le domaine C-terminal : La phosphorylation des résidus Tyr^{1316 et 1322} est moins bien définie. Elle serait impliquée dans la liaison et l'activation des PI3K (Levy-Toledano et al., 1994).

Après son activation par l'insuline, le récepteur est internalisé dans les compartiments d'endocytose où s'effectue la dissociation de l'insuline avec le récepteur ainsi que sa déphosphorylation. Le récepteur sera ensuite adressé aux lysosomes pour sa dégradation ou recyclé vers la membrane plasmique (Di Guglielmo et al., 1998).

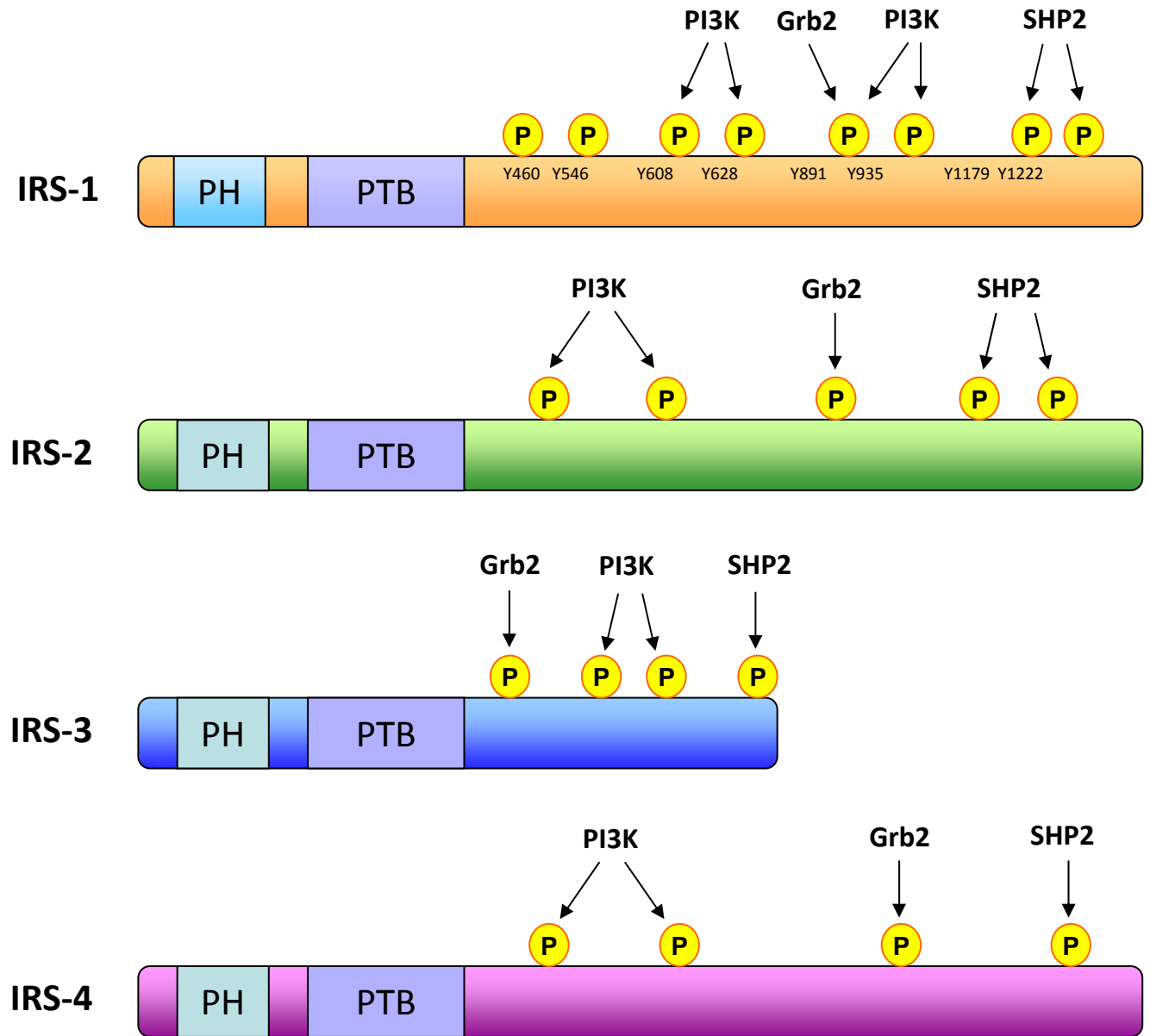


Figure 7 : Structure des protéines IRS

Les protéines IRS sont composées dans l'extrémité N-terminale d'un domaine PH (Pleckstrin Homology) qui lie les phospholipides membranaires, d'un domaine PTB (Phosphotyrosine Binding) qui interagit avec les résidus tyrosines phosphorylés du récepteur de l'insuline. En C-terminal, les IRS possèdent plusieurs Résidus tyrosines phosphorylés reconnus par les domaine SH2 (Src Homology domain 2) de la PI3K, SHP2 ou Grb2.

I.3.2.2 Les protéines adaptatrices IRS (Insulin Receptor Substrate)

Le récepteur de l'insuline est capable d'interagir avec plusieurs substrats intracellulaires tels que les protéines adaptatrices IRS, Gab, Shc, Grb2, APS (Adapter Protein with a PH and SH2 domain) et les protéines de la famille SH2-B. Les IRS sont responsables des effets métaboliques de l'insuline, elles permettent la transduction du signal de l'hormone et le maintien de l'homéostasie glucidique (Biddinger and Kahn, 2006). Il existe six protéines IRS codées par six gènes différents, la plus étudiée étant IRS-1 et IRS-2. Ces deux protéines sont ubiquitaires entre les différents types cellulaires et les espèces (Giovannone et al., 2000). IRS-3 est la forme la plus abondante dans le tissu adipeux du rongeur, mais est absent chez l'homme (Bjornholm et al., 2002). La protéine IRS-4 est exprimée dans de nombreux organes comme le foie, le pancréas, le muscle, le cerveau, le thymus ainsi que les reins (Fantin et al., 1999 ; Giovannone et al., 2000). Deux derniers membres ont été identifiés plus récemment, IRS-5 retrouvé principalement au niveau du foie et des reins, et IRS-6 essentiellement exprimé au niveau des muscles squelettiques (Cai et al., 2003).

Les protéines adaptatrices IRS ne possèdent aucune activité catalytique, elles servent de pont entre le récepteur de l'insuline et les différents effecteurs, tels que la PI3-K ou Grb2.

IRS-1 et IRS-2 possèdent une structure relativement similaire tandis que IRS-3 et IRS-4 diffèrent dans leur région C-terminale (**figure 7**).

Les protéines IRS ont une organisation comparable entre elles, et peuvent être divisées en deux domaines :

- Dans la partie N-terminale :

- Un domaine PH (Pleckstrin Homology Domain), qui reconnaît les phospholipides membranaires, permettant ainsi d'ancrer les IRS à la membrane plasmique et de stabiliser leur association avec le récepteur de l'insuline (Yenush et al., 1996).

- Un domaine PTB (Phospho Tyrosine Binding), qui reconnaît les résidus tyrosine phosphorylés, permettant donc l'interaction avec le domaine juxtamembranaire de la sous-unité β du récepteur de l'insuline (Eck et al., 1996).

- Dans la partie C-terminale :

Les protéines IRS possèdent dans cette région de nombreux sites potentiels de phosphorylation sur tyrosine et serine (White et al., 2002). Les phosphorylations sur tyrosine sont des motifs impliqués dans l'association des IRS avec des protéines contenant des

domaines SH2 (Src Homology domain 2) comme la PI3-K ou Grb2, permettant donc la transduction du signal insulinaire. En revanche les phosphorylations sur sérine permettent de moduler la signalisation de l'insuline, en effet ces phosphorylations permettent un rétrocontrôle négatif de cette voie de signalisation.

I.3.2.3 Les Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) de classe 1

Les PI3-K font partie d'une famille de lipide kinases qui est divisée en quatre classes distinctes nommées 1a, 1b, 2 et 3. La classe 1 est celle majoritairement impliquée dans la voie de signalisation de l'insuline, les autres classes auraient un rôle mineur dans les actions métaboliques de l'insuline (Shepherd, 2005).

Les PI3-K de classe 1 se présentent sous forme d'hétérodimères composés d'une sous-unité p85 régulatrice et d'une sous-unité p110 catalytique.

La sous-unité p85 regroupe les isoformes p85 α , p85 β , mais aussi des formes plus courtes p55 α , p50 α et p55 γ , produits selon un épissage alternatif. Toutes ces isoformes possèdent deux domaines SH2, un en C-terminal (cSH2) et un en N-terminal (nSH2) et permettent l'association avec les phosphotyrosines de récepteurs tyrosine kinase ou de protéines adaptatrices comme les IRS. La sous-unité p110 se fixe entre les deux domaines SH2 (iSH2). Les isoformes longues de p85 possèdent en plus un domaine SH3 en région N-terminale ainsi qu'un domaine GAP (GTase Activating Protein) (Mellor et al., 2012).

La sous-unité catalytique existe sous quatre isoformes : p110 α , p110 β , p110 δ , et p110 γ . Ces sous-unités sont exprimées dans de nombreux tissus, mise à part la sous-unité p110 γ qui n'est exprimée que dans les cellules hématopoïétiques. Ces sous-unités possèdent un domaine de liaison à la sous-unité p85 ABP (Adaptor Binding Protein), un domaine de liaison à la protéine RAS, un domaine C2 permettant la liaison à la membrane, un domaine hélicoïdal et un domaine catalytique. Ce domaine catalytique possède une activité lipide kinase qui permet la phosphorylation du PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) en PIP₃ (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate) impliquée dans la relocalisation à la membrane plasmique de PKB (Protein Kinase B) et de PDK-1 (Phosphoinositide-Dependent Kinase 1). Ce domaine possède également une faible activité protéine kinase, impliqué dans la sérine phosphorylation de la sous-unité p85 entraînant une diminution de l'activité PI3-K ainsi qu'une sérine phosphorylation de la protéine IRS-1 (Tanti et al., 1994).

A l'état basal l'activité catalytique est inhibée par la liaison entre le domaine hélicoïdal de p110 et le domaine nSH2 de p85. En présence d'insuline, il y a dissociation des deux sous-unités à ce niveau permettant l'activation du domaine catalytique et la génération de PIP₃ (Mellor et al., 2012 ; Shepherd, 2005).

I.3.2.4 La Phosphoinositide Dependent Kinase-1 (PDK-1)

La protéine PDK-1 est une sérine/thréonine kinase exprimée dans tous les tissus. Cette enzyme est constitutivement active par autophosphorylation et son activité est régulée par sa localisation. En effet elle possède un domaine PH capable de se fixer au PIP₃ formés par la PI3-K (Casamayor et al., 1999). PDK-1 possède de nombreux substrats intracellulaires qui sont des protéines de la famille AGC, comprenant les kinases PKB (Protein Kinase B), plusieurs membres de la famille des PKC (Protein Kinase C) dont les PKC atypiques et la p70 S6 kinase. Parmi ses substrats, seul PKB possède un domaine PH, ce qui permet sa co-localisation avec PDK-1 à la membrane et la phosphorylation de PKB sur Thr³⁰⁸ par PDK-1 (Bayascas et al., 2008).

I.3.2.5 Les Protéines Kinase B (PKB)

Les PKB sont des sérine/thréonine kinases dont la famille compte trois membres : PKB α , PKB β et PKB γ (encore appelées Akt1, Akt2 et Akt3 respectivement). PKB α et PKB β sont ubiquitaires et enrichies dans les organes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique : le foie, le muscle et le tissu adipeux. La forme PKB γ est principalement présente dans le cerveau, les testicules et le pancréas. Les PKB sont constituées d'un domaine PH capable de lier le PIP₃, un domaine kinase et d'un domaine régulateur en C-terminal. A l'état basal, la PKB se retrouve principalement au niveau du cytosol, lors d'une stimulation par l'insuline il y a formation de PIP₃ par la PI3-K qui va permettre la co-localisation de PDK-1 et PKB à la membrane plasmique. La PDK-1 va alors phosphoryler PKB sur la Thr³⁰⁸, l'activant partiellement et induire sa dissociation de la membrane plasmique. Dans le cytoplasme PKB va être phosphorylée sur la ser⁴⁷³ par le complexe mTOR//Rictor, ce qui aboutit à son activation complète (Bozulic and Hemmings, 2009).

Les PKB ont de nombreuses cibles et sont impliquées dans différents effets cellulaires. Les PKB interviennent dans la prolifération cellulaire en activant la voie mTORC1 et p70S6K. Dans le métabolisme, les PKB sont impliquées dans l'activation du transport du glucose

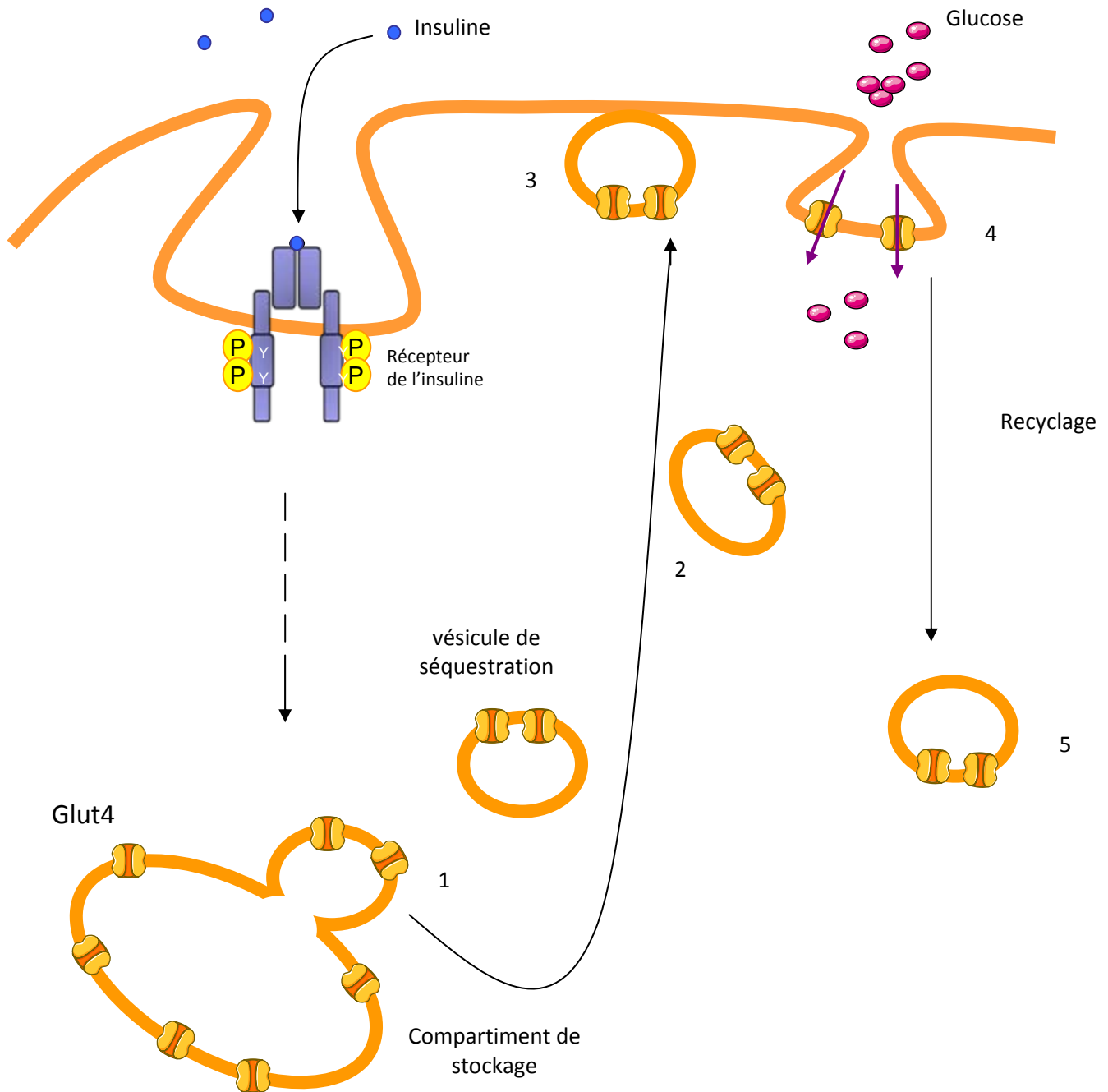


Figure 8 : Régulation du trafic vésiculaire de Glut4 induit par l'insuline

Après stimulation par l'insuline, les transporteurs Glut4, présents dans les vésicules de stockage, sont adressés par l'intermédiaire des vésicules de séquestration (1) à la membrane plasmique (2). Suite à la fusion des vésicules avec la membrane (3), le glucose rentre dans la cellule par l'intermédiaire de Glut4 (4). Le transporteur est ensuite internalisé et recyclé (5).

induit par une stimulation d'insuline. Elles phosphorylent la protéine AS160 (Akt Substrate of 160 kDa) qui est une protéine interagissant avec les petites protéines G appelées Rabs, qui sont impliquées dans le trafic vésiculaire. La phosphorylation, d'AS160 induit la translocation des vésicules contenant le transporteur de glucose GLUT4 à la membrane plasmique. D'autre part les PKB sont capable de phosphoryler GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) ce qui induit l'activation de la glycogen synthase, aboutissant à la production de glycogène et de lipides. Enfin les PKB interviennent dans l'inhibition de la néoglucogenèse en phosphorylant PGC-1 (PPAR γ Coactivator-1) et Foxo1 aboutissant à un blocage de la transcription des gènes codants pour la PEPCCK (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase) et la G6P (Glucose 6-Phosphatase) (Manning and Cantley, 2007 ; Nakae et al., 2001).

I.3.2.6 Les Protéines Kinase C atypiques (PKC)

Les PKC sont regroupées en trois classes : les classiques, les nouvelles et les atypiques. Les formes classiques et nouvelles requièrent le diacylglycérol et/ou le calcium pour leur activation, tandis que les formes atypiques nécessitent les PIP₃ et sont insensibles au diacylglycérol et au calcium. Lors d'une stimulation à l'insuline les PKC atypiques sont recrutées à la membrane plasmique et phosphorylées par PDK-1. Les PKC atypiques sont impliquées dans la régulation du transport de glucose dans les adipocytes et les cellules musculaires, ainsi que dans le rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation de l'insuline en augmentant la sérine phosphorylation d'IRS-1 (Farese, 2002).

I.3.2.7 Le transport de glucose

Un effet métabolique de l'insuline est d'augmenter le transport de glucose, ce processus nécessite la présence de transporteurs à la membrane plasmique. Ces transporteurs sont les GLUT ; 14 isoformes ont été décrites jusqu'à aujourd'hui et sont regroupées en trois classes selon leur similarités (Thorens and Mueckler, 2010). Ces transporteurs se composent de 12 hélices transmembranaires et permettent un transport facilité du glucose dans la cellule. Les membres les mieux caractérisés font partie de la classe I, il s'agit de GLUT1, GLUT2, GLUT3 et GLUT4.

Le transporteur GLUT1 est ubiquitaire, il est constitutivement présent à la membrane plasmique et assure le transport basal de glucose. GLUT2 est exprimé dans le foie, l'intestin et les cellules β du pancréas. Il agit comme un « senseur » de la concentration en glucose, il

assure un équilibre entre la concentration extérieure et intérieure de la cellule. GLUT3 est majoritairement présent au niveau des neurones, il est aussi retrouvé dans des vésicules de stockage dans les lymphocytes et les macrophages où il peut être adressé à la membrane plasmique en cas de besoin, par des mécanismes encore inconnus.

Le transporteur GLUT4 est responsable du transport de glucose induit par l'insuline. Il est exprimé dans le tissu adipeux blanc et brun ainsi que dans les muscles squelettiques et cardiaques. La localisation subcellulaire de ce transporteur est contrôlée par des mécanismes complexes de trafic intracellulaires (Kaddai et al., 2008; Leto and Saltiel, 2012). En l'absence de stimulation insulinique, GLUT4 trafique principalement entre différents compartiments intracellulaires et se retrouve principalement séquestré dans des vésicules de stockage périnucléaires. Lors d'une stimulation insulinique, le trafic intracellulaire de GLUT4 va être modifié et ces vésicules de séquestration vont par des mécanismes complexes fusionner avec la membrane plasmique (**figure 8**) (Kaddai et al., 2008; Leto and Saltiel, 2012). Cette translocation de GLUT4 est principalement dépendante de l'activation de la voie PKB/AS160 et des PKC atypiques (Eguez et al., 2005 ; Farese, 2002). Le trafic intracellulaire est également contrôlé par différentes protéines en particulier des GTPase de la famille Rab dont la GTPase Rab4b (Kaddai et al., 2009; Kaddai et al., 2008). Le muscle squelettique est le tissu majoritairement impliqué dans la captation du glucose suite à un repas (environ 75-85% de la captation totale du glucose).

I.3.3. Régulations négatives de la voie de signalisation de l'insuline

Le rétrocontrôle négatif est un processus physiologique induit par l'insuline afin de réguler finement son signal et ses effets métaboliques. Cependant lors de l'obésité et du diabète de type 2 on observe une dérégulation de ce processus, ce qui participe activement au phénomène d'insulinorésistance.

I.3.3.1 Inhibition du récepteur de l'insuline

Le récepteur de l'insuline devient actif suite à la phosphorylation de ses sous-unités β sur des résidus tyrosine. La majorité des régulations négatives de ce récepteur s'effectue au

niveau de ces tyrosines phosphorylations. La protéine PC-1 (Plasma Cell membrane glycoprotein-1) inhibe l'autophosphorylation du récepteur en se liant aux sous-unités α empêchant ainsi le changement de conformation des sous-unités β qui ne peuvent alors plus s'autophosphoryler (Maddux and Goldfine, 2000). Les phosphotyrosine phosphatases (PTP) sont responsables de la désactivation du récepteur de l'insuline en se liant directement à celui-ci et en le déphosphorylant. Les PTP les plus étudiées sont PTP1B (PTPase-1B) et LAR (Leukocyte Antigen-Related phosphatase). De manière intéressante les protéines PC-1 et PTP1B sont retrouvées augmentées chez les individus résistants à l'insuline.

Le récepteur de l'insuline peut être glycosylé en présence de glucose, il s'agit de l'ajout d'un groupement N-acétyl-glucosamine sur un résidu sérine ou thréonine. Cette glycosylation empêche par encombrement stérique la phosphorylation et l'activation du récepteur en réponse à l'insuline (Youngren, 2007).

Comme évoqué précédemment le récepteur de l'insuline se situe dans des cavéoles, ce qui est nécessaire pour sa fonctionnalité. Les gangliosides sont des sphingolipides présents en excès lors de l'obésité, or un excès de gangliosides est associé à une délocalisation du récepteur de l'insuline hors des cavéoles, le rendant ainsi inactivable (Tagami et al., 2002).

La régulation de cette voie de signalisation s'effectue aussi en inhibant l'interaction du récepteur avec ses substrats. Les protéines de la famille des Grb7 (Growth factor Receptor Bound protein) comprenant les Grb7, 10 et 14 sont des protéines adaptatrices régulant les récepteurs à activité tyrosine kinase. Grb10 et Grb14 se lient sur le récepteur de l'insuline phosphorylé sur tyrosine *via* leur domaine SH2 et leur domaine BPS (Between PH and SH2), cette liaison inhibe l'interaction du récepteur avec ses substrats IRS (Nouaille et al., 2006). La protéine Grb14 est retrouvée augmentée dans le tissu adipeux de souris obèses *ob/ob* ainsi que chez les individus atteints de diabète de type 2 (Cariou et al., 2004).

Enfin les protéines SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) régulent négativement la voie de signalisation de l'insuline en s'associant au récepteur de l'insuline activé et en inhibant la phosphorylation d'IRS-1. Leur expression est augmentée par l'insuline lors d'un rétrocontrôle négatif mais aussi par les cytokines ou le LPS. *In vivo*, SOCS3 est augmenté dans le tissu adipeux d'animaux et de patients obèses (Emanuelli et al., 2001).

IRS-1

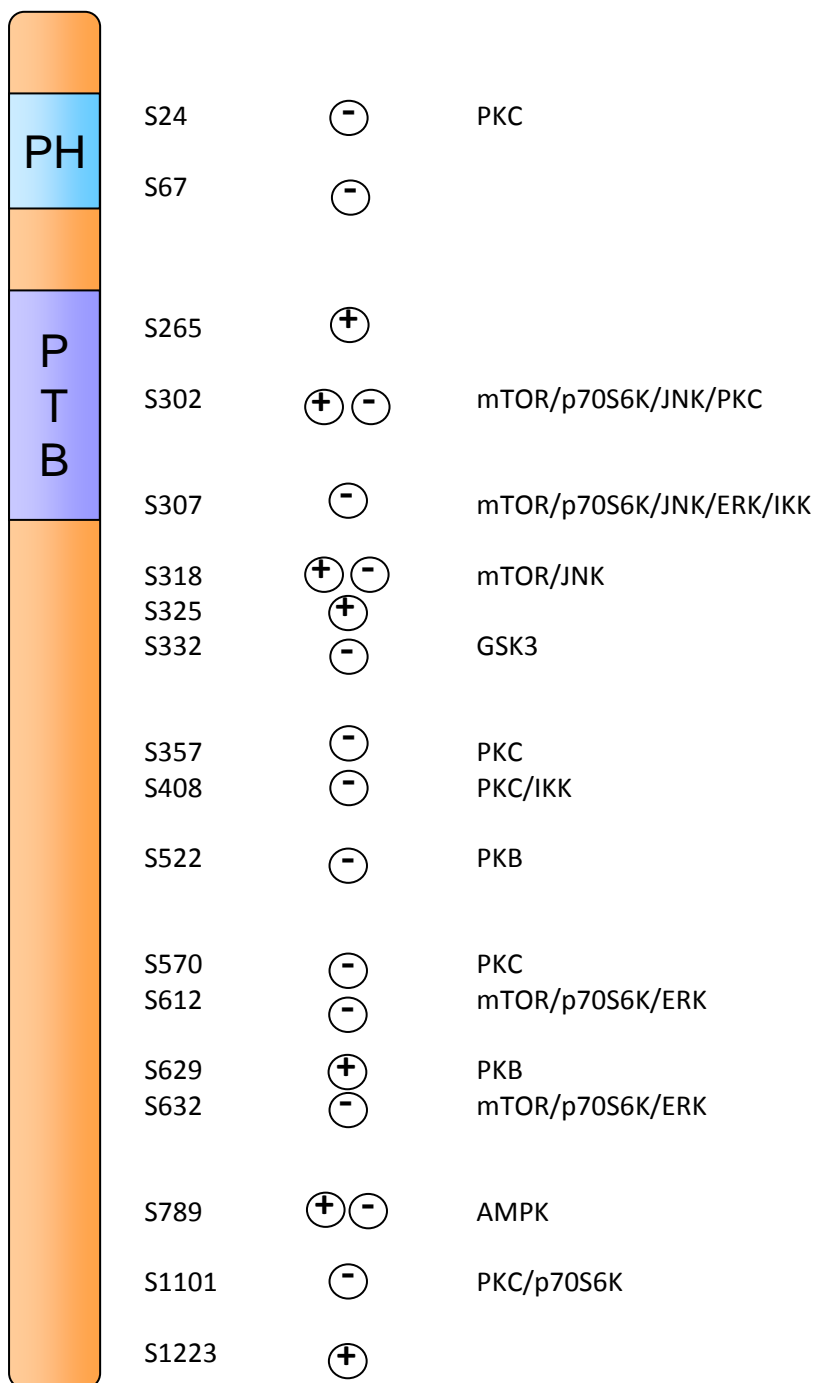


Figure 9 : Les phosphorylations sur sérine de IRS-1

Les phosphorylations sur des résidus sérine par des kinases telles que mTOR, p70S6K ou JNK inhibent la voie de signalisation de l'insuline (-). A l'inverse certains sites de phosphorylation ont des effets positifs sur la réponse à l'insuline (+).

I.3.3.2 Inhibition d'IRS-1

Lors de l'activation de la voie de signalisation insulinique IRS-1 est phosphorylé sur des résidus tyrosine ce qui permet la transduction du signal. En conditions physiologiques, les phosphorylations sur sérine d'IRS-1 sont des mécanismes de rétrocontrôles négatifs de l'insuline sur sa propre voie permettant de réguler finement son signal. Lors de l'obésité et du diabète, il y a une dérégulation de l'équilibre entre tyrosine phosphorylation et sérine phosphorylation qui fait pencher la balance en faveur des sérines phosphorylations.

Les phosphorylations sur sérine d'IRS-1 se situent dans les régions proche du domaine PTB afin d'inhiber leur interaction avec le récepteur de l'insuline, mais aussi dans la région C-terminale ce qui empêche leur liaison avec la PI3-K (Liu et al., 2004 ; Mothe and Van Obberghen, 1996). Les phosphorylations de la ser³⁰⁷ et de la ser³¹² induisent également la dégradation de IRS-1 par le protéasome (Greene et al., 2004 ; Takano et al., 2001). IRS-1 est phosphorylé par de nombreuses sérine/thréonine kinases activées par l'insuline, tel que mTOR, p70S6K, PKC et ERK. L'inflammation présente lors de l'obésité joue un rôle important dans l'activation de kinases de stress capables de phosphoryler IRS-1 avec des conséquences plus délétères c'est le cas de JNK, ERK, IKK β , mTOR et p70S6K (Tanti and Jager, 2009) (**figure 9**).

Toutefois il est important de souligner que la phosphorylation d'IRS-1 sur des résidus sérine peut avoir des effets positifs sur la voie de signalisation de l'insuline. Ces sérines phosphorylations sont majoritairement dues à l'action de la PKB, et ont pour but de protéger ces sites de l'action des phosphatases ou d'empêcher la phosphorylation de sites inhibiteurs. La phosphorylation d'IRS-1 sur des résidus sérine est un élément prépondérant dans sa régulation mais d'autres mécanismes sont impliqués dans la régulation négative de la voie de l'insuline au niveau de cette protéine. Comme le récepteur de l'insuline, IRS-1 peut aussi être glycosylé lors d'un excès de glucose intracellulaire ayant pour effet une diminution de la signalisation insulinique (Vosseller et al., 2002). A l'instar du récepteur, IRS-1 fait l'objet de tyrosine phosphorylations lors de son activation, et peut aussi être la cible de phosphotyrosine phosphatases tel que PTP1B. Comme évoqué précédemment les protéines SOCS sont capable d'altérer l'interaction entre le récepteur de l'insuline et IRS-1, il est aussi démontré que SOCS1 et SOCS3 s'associent aux IRS induisant leur ubiquitination et leur dégradation (Rui et al., 2002). IRS-1 peut également être ubiquitiné par Cbl-b et CUL7, ce qui aboutit également à sa dégradation par le protéasome (Nakao et al., 2009 ; Xu et al., 2008).

I.3.3.3 Les lipides phosphatases

La formation des PIP_3 par la PI3-K est importante dans la transduction du signal de l'insuline. Un mécanisme de régulation négative de cette voie de signalisation s'effectue à ce niveau, au travers de deux lipides phosphatases que sont PTEN (Phosphatase and Tensin homology) et SHIP-2 (SH2-containing 5'Inositol Phosphatase). PTEN et SHIP-2 hydrolysent les PIP_3 et PIP_2 en PIP, la diminution de PIP_3 présent à la membrane plasmique s'accompagne d'une inhibition de la voie de signalisation de l'insuline. Il est intéressant de noter que PTEN est retrouvé augmenté dans les muscles de rat obèse et que SHIP-2 est augmenté dans les muscles et le tissu adipeux de souris obèses diabétiques *db/db*.

I.3.3.4 Les céramides et la nitrosylation

Les céramides sont produites lors de la synthèse *de novo* de glycosphingolipides ou lors de leur catabolisme. Ils sont retrouvés augmentés dans des modèles d'animaux obèses résistants à l'insuline (Langeveld and Aerts, 2009). Les céramides bloquent la voie de signalisation de l'insuline au niveau des protéines PKB. Ils activent les PKC qui s'associent aux PKB et empêchent leurs phosphorylations par PDK-1. Un autre effet des céramides est d'activer la phosphatase PP2A qui est capable de déphosphoryler les PKB (Lipina and Hundal, 2011).

L'obésité est associée à l'augmentation de l'expression de la NO synthase inducible (iNOS) dans les tissus sensibles à l'insuline chez l'humain et la souris. Cette enzyme produit de grandes quantités de NO induisant la nitrosylation des protéines. La nitrosylation des protéines est augmentée chez les patients atteints de diabète de type 2. Chez les souris obèses et diabétiques on retrouve une augmentation de la nitrosylation du récepteur de l'insuline, d'IRS-1 et des PKB dans le muscle squelettique. Ainsi la nitrosylation pourrait jouer un rôle dans l'insulinorésistance (Kaneki et al., 2007).

Chapitre II : Inflammation du tissu adipeux associée à l'obésité et l'insulinorésistance

II.1 Généralités

Les premières évidences d'un lien physiopathologique entre obésité, inflammation et insulinorésistance ont été suggérées au début du 20^{ème} siècle par l'observation que les salicylates, qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires, avaient des effets bénéfiques sur l'hyperglycémie des diabétiques (Williamson, 1901). C'est ensuite dans les années 1990 que ce concept a été revisité par la mise en évidence d'une sécrétion augmentée de TNF α par le tissu adipeux de souris obèses et la démonstration que cette cytokine pro-inflammatoire pouvait inhiber la signalisation de l'insuline (Hotamisligil et al., 1993). De nombreuses études au cours de ces dernières années ont clairement confirmé ce concept en démontrant que les individus obèses insuline-résistants se trouvent dans un état d'inflammation chronique de bas grade qui se caractérise par une augmentation modérée des taux plasmatiques de nombreux médiateurs inflammatoires. Il s'agit notamment de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha), l'IL-6 (Interleukine-6), l'IL-1 β (Interleukine-1 β), l'IL-8 (Interleukine-8), le CD40L et le MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1), mais aussi d'autres protéines telles que la CRP (C-Reactive Protein), le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1), la fibrinogène, la protéine Amyloïde Sérique de type A (SAA) ainsi que l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra). Les niveaux plasmatiques des formes solubles des récepteurs des cytokines comme le TNF-R et l'IL-R ainsi que la leptine et l'ostéopontine sont également augmentés chez les individus obèses (Antuna-Puente et al., 2008 ; Berg and Scherer, 2005 ; Juge-Aubry et al., 2005). Des médiateurs lipidiques comme les prostaglandines et les leucotriènes participent également à l'inflammation associée à l'obésité (González-Pérez and Claria, 2010, Mothe-Satney et al., 2012). Les prostaglandines sont des facteurs lipidiques synthétisés à partir d'acide arachidonique sous l'action des cyclooxygénases (COX) ce qui produit des intermédiaires, lesquels après l'action des prostaglandines synthases deviennent des prostaglandines. Il existe deux cyclooxygénases, COX-1 est présente en permanence et permet la production basale de prostaglandines. COX-2, en revanche, est induite par des stimuli inflammatoires

(cytokines), et certaines prostaglandines synthétisées par COX-2 sont responsables de l'augmentation globale du taux de prostaglandines en situations inflammatoires. L'utilisation de l'aspirine et des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui agissent comme des inhibiteurs des COX met en avant l'importance la participation des prostaglandines dans les phénomènes inflammatoires (Ricciotti and FitzGerald, 2010).

Cette inflammation associée à l'obésité présente des caractéristiques bien différentes des situations inflammatoires classiques induites par exemple par une infection. L'origine de l'inflammation associée à l'obésité est probablement métabolique et l'excès de nutriments joue un rôle important en modifiant la biologie des cellules métaboliques dont les adipocytes. Ces modifications pourraient être à l'origine du développement de cette inflammation. Cette inflammation, comme mentionné précédemment, est modérée mais modifie la composition des cellules immunitaires dans les tissus métaboliques avec comme conséquences la formation d'un environnement tissulaire pro-inflammatoire qui se maintient de manière chronique. Toutes ces caractéristiques qui distinguent l'inflammation associée à l'obésité d'une inflammation dite classique ont conduit à la nommée meta-inflammation ou encore inflammation métabolique. Cette inflammation métabolique est désormais reconnue comme un élément important dans le développement de l'insulinorésistance ou du diabète de type 2 (Gregor and Hotamisligil, 2011).

Il existe une connexion étroite entre accumulation de tissu adipeux et développement de cette inflammation métabolique. De plus, la perte de poids est associée à une diminution et à la normalisation des niveaux plasmatiques d'au moins une partie des médiateurs inflammatoires (Forsythe et al., 2008) mettant ainsi le tissu adipeux au centre de ce processus inflammatoire. Les différentes études au cours de ces dernières années ont permis de mettre en évidence un remodelage important de différentes populations de cellules de l'immunité innée et acquise dans le tissu adipeux de souris et patients obèses. Ces études ont permis de mettre en lumière des connections étroites entre ces cellules immunitaires, des modifications du métabolisme des adipocytes et le développement de l'insulinorésistance. Il apparaît donc désormais que l'inflammation du tissu adipeux au cours de l'obésité est un événement important connectant l'augmentation d'adiposité au développement des complications de l'obésité.

Nous nous attacherons dans les paragraphes suivants à décrire certaines des causes potentielles de l'inflammation du tissu adipeux et les médiateurs cellulaires impliqués dans cette inflammation.

II.2 Causes de l'inflammation du tissu adipeux

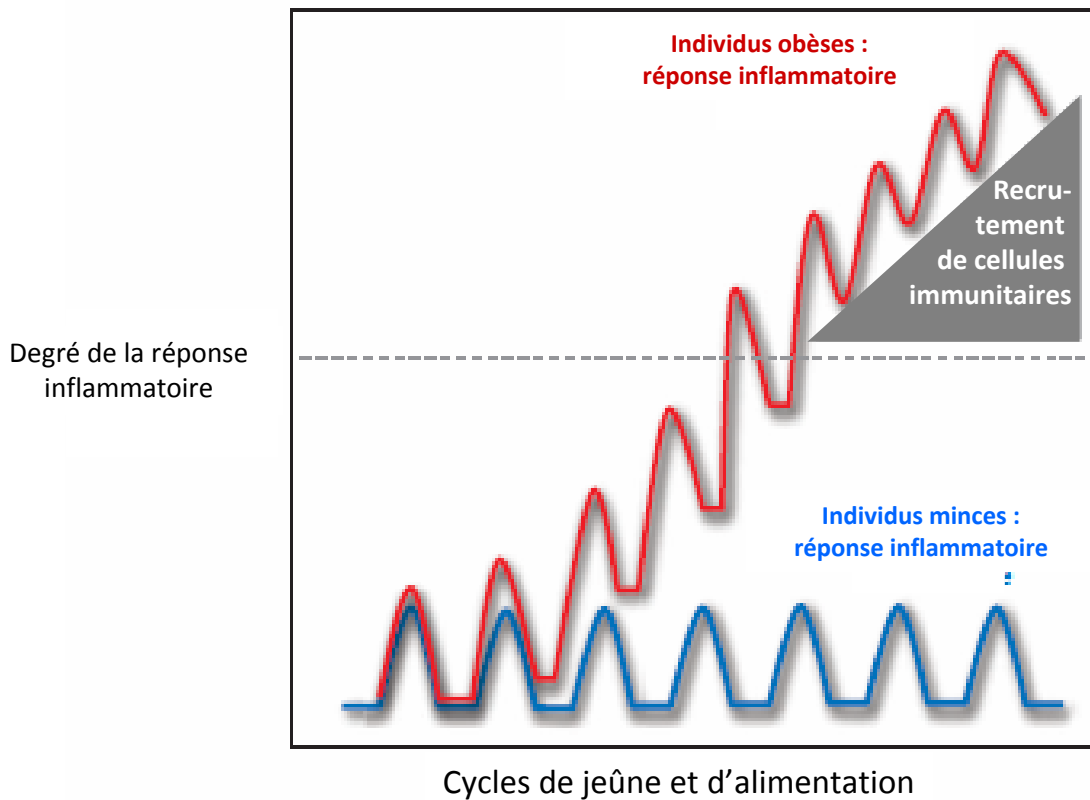
Différents facteurs et processus biologiques pourraient intervenir dans la mise en place de l'inflammation du tissu adipeux. Ainsi, lors de l'obésité, l'augmentation importante du flux de nutriments dans les adipocytes, la dysfonction de certaines organelles dans les adipocytes et les cellules de la fraction stroma-vasculaire en particulier les cellules immunitaires, ainsi que des mal-adaptations au remodelage du tissu adipeux pourraient contribuer à l'induction de nombreux stress et voies de signalisation participant à l'initiation de l'inflammation de ce tissu. Des modifications du microbiote intestinal lors de l'obésité pourraient également contribuer à l'inflammation du tissu adipeux. Cette inflammation locale contribue activement au développement d'une inflammation systémique et donc aux désordres métaboliques qui lui sont associés.

II.2.1 Nutriments et inflammation du tissu adipeux

L'augmentation du flux de nutriment dans les adipocytes pourrait être l'évènement initiateur de l'inflammation du tissu adipeux. Ainsi, l'administration de lipides dans des souris induit, après quelques heures, une réponse inflammatoire (Watt et al., 2006). A l'inverse une perte de poids suite à une restriction calorique entraîne une diminution de l'inflammation.

Une des théories pour expliquer l'origine de l'inflammation associée à l'obésité serait que les nutriments eux-mêmes soient naturellement inflammatoires. En condition normale d'apport de nutriments, les adipocytes pourraient s'adapter à ce stress métabolique en augmentant l'expression de protéines anti-inflammatoires dans le but d'atténuer cette inflammation physiologique induite par la prise d'un repas. Certaines études sont en accord avec cette hypothèse. Par exemple, la protéine STAMP2 est augmentée dans le tissu adipeux après la prise d'un repas et cette protéine a des propriétés anti-inflammatoires. L'absence de STAMP2 augmente l'inflammation du tissu adipeux de souris soumises à un régime standard et les adipocytes en absence de STAMP2 ont une réponse inflammatoire exacerbée. Lors de

A



B

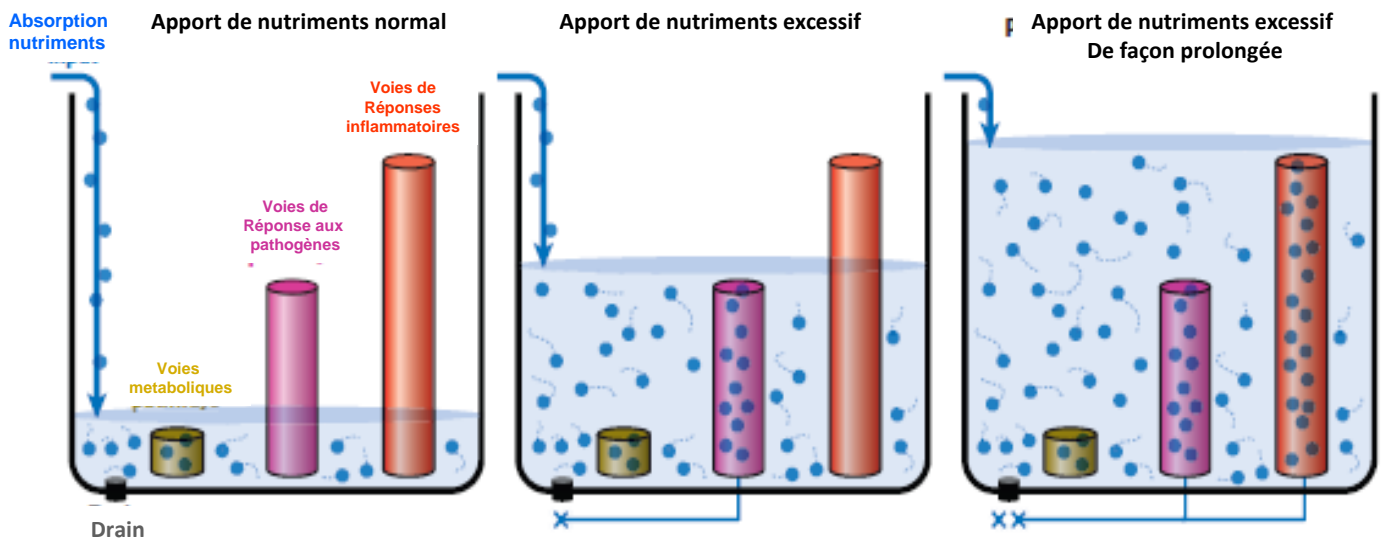


Figure 10 : Développement de l'inflammation induit par l'excès de nutriments lors de l'obésité

- (A) Lors de la prise alimentaire on observe une réponse inflammatoire transitoire qui est exacerbée chez l'individus obèses et participe au recrutement de cellules immunitaires.
- (B) Suivant la concentration des nutriments différentes voies inflammatoires vont être activées.

l'obésité, l'augmentation de STAMP2, induite par la prise d'un repas, est perdue suggérant une mal-adaptation des réponses physiologiques permettant de moduler l'inflammation induite par les nutriments (Wellen et al., 2007). Une autre connexion possible entre inflammation et nutriment serait que la prise alimentaire, en modifiant la perméabilité intestinale, augmente les molécules pro-inflammatoires dans la circulation. Ceci a été démontré expérimentalement chez la souris mais également chez l'homme avec l'observation que lors d'un apport normal de nutriments, les taux circulants de lipopolysaccharides (LPS) bactériens dérivés de la flore intestinale augmentent après un repas de manière transitoire consécutivement à une modification de la perméabilité intestinale. Dans les situations d'obésité, la perméabilité intestinale est modifiée et les taux circulants de LPS sont en permanence plus élevés (Amar et al., 2008 ; Teixeira et al., 2012).

A partir de cette notion d'un effet inflammatoire naturel des nutriments, Gregor et Hotamisligil ont proposé le concept de la pulsativité de la réponse inflammatoire en fonction des cycles de prise de repas (**figure 10A**). Ainsi, un apport normal en nutriment induirait des pics d'inflammation modérée qui entraînerait une réponse adaptative des adipocytes permettant de résoudre cette inflammation lorsque les nutriments ont été métabolisés. Dans les conditions d'obésité ou de suralimentation, la réponse inflammatoire à la prise de nourriture va être plus intense et plus fréquente alors que la capacité des adipocytes à résoudre cette inflammation va être moins efficace. En conséquence, le niveau d'inflammation de base du tissu adipeux va augmenter et lorsqu'il atteindra un certain niveau entraînera le recrutement de cellules immunitaires qui vont amplifier cette inflammation (Gregor and Hotamisligil, 2011).

Une autre explication potentielle à l'origine de l'inflammation du tissu adipeux est que dans les conditions normales d'apport en nutriment, ceux-ci ne sont pas inflammatoires mais lorsqu'ils se trouvent en excès ils le deviennent, principalement en étant reconnus par les systèmes de détection des pathogènes comme les TLR (Toll-like receptor), les inflammasomes ou les NOD (Nucleotide Oligomerization Domain) ou certaines kinases comme la PKR (Gregor and Hotamisligil, 2011). Les TLR présents sur les macrophages reconnaissent certains composants des parois bactériennes comme le LPS ou les peptidoglycans, permettant ainsi de lutter contre les infections. Il a été montré que les adipocytes expriment les TLR4 et TLR2 et que ceux-ci peuvent interagir avec les acides gras saturés (Shi et al., 2006a). La PKR qui reconnaît les RNAs doubles brins viraux est activée

après une infusion de lipides chez la souris et son activité est augmentée dans le tissu adipeux de souris obèses. L'invalidation de la PKR ou son inhibition pharmacologique protège de l'insulinorésistance associée à l'obésité (Nakamura et al., 2014; Nakamura et al., 2010). L'inflammasome NLRP3 peut être activé par des céramides dérivés des acides gras ou par le glucose et son activation est impliquée dans l'insulinorésistance (Lee and Lee, 2014 ; Stienstra et al., 2011; Vandanmagsar et al., 2011; Wen et al., 2011).

Ainsi, en condition normale d'apport de nutriments, ceux-ci au sein des adipocytes activent des voies métaboliques permettant de les métaboliser correctement et d'assurer ainsi une homéostasie gluco-lipidique. Lors d'un apport plus important ou plus prolongé, l'excès de nutriments pourrait être reconnu par les systèmes de détection des pathogènes présents dans les adipocytes activant différentes kinases de stress comme les IKK ou JNK, qui en retour bloque les voies métaboliques (**figure 10B**). Parallèlement, l'activation de ces kinases va conduire à une production modérée et locale de médiateurs inflammatoires (cytokines/chimiokines) par les adipocytes qui vont permettre le recrutement de cellules immunitaires. Ces dernières vont amplifier la réaction inflammatoire contribuant à maintenir le blocage des voies métaboliques dans les adipocytes et créant ainsi un cercle vicieux inflammatoire (Gregor and Hotamisligil, 2011).

Nous verrons en détail dans la troisième partie de ce mémoire comment les systèmes de détection des pathogènes participent au développement de l'insulinorésistance.

II.2.2 Stress du réticulum endoplasmique et inflammation du tissu adipeux

La perturbation de l'homéostasie de différentes organelles induite par une augmentation des flux de nutriments dans les cellules métaboliques dont les adipocytes, joue également un rôle important dans l'inflammation et les complications métaboliques associées à l'obésité. Le réticulum endoplasmique (RE) est une des organelles dont la dysfonction est associée avec le développement de l'inflammation et de l'insulinorésistance (Cnop et al., 2011; Gregor and Hotamisligil, 2011; Ozcan et al., 2004).

Le RE est le premier compartiment au travers duquel transitent les protéines sécrétées. Il joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie calcique et lipidique et son fonctionnement correct permet d'assurer le repliement des protéines et leur trafic intracellulaire. Plusieurs situations comme un excès de nutriments, une diminution de l'oxygène disponible, une augmentation du stress oxydant, une perturbation des flux

calciques etc... vont conduire à altérer la capacité du RE à contrôler correctement le repliement des protéines. Lorsque cette capacité est dépassée, l'homéostasie du RE est altérée et ceci s'accompagne d'une accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE. Cette situation correspond à ce que l'on nomme : le stress du RE. Pour diminuer ce stress et rétablir un fonctionnement normal du RE, les cellules vont activer une réponse adaptative appelée UPR (Unfolded Protein Response). Dans ce but, l'UPR diminue la traduction globale des protéines, et induit la transcription de protéines spécifiques impliquées dans le contrôle des repliements protéiques, des N-glycosylations, de la dégradation protéique contrôlée par le RE (ERAD), de la balance d'oxydo-réduction, du contrôle de qualité et de la biogenèse des lipides. Si la restauration de l'homéostasie du RE échoue par exemple en cas de stress sévère et/ou prolongé, alors l'UPR augmente l'expression de facteurs pro-apoptotiques afin d'éliminer les cellules (Cnop et al., 2011; Flamment et al., 2012 ; Gregor and Hotamisligil, 2011; Ozcan et al., 2004).

Trois senseurs transmembranaires interviennent dans l'activation de l'UPR et l'adaptation aux stress du RE : PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase), IRE1 (Inositol Requiring Enzyme) et ATF-6 (Activating Transcription Factor). En conditions normales, ces protéines sont maintenues inactive *via* leur liaison à la chaperonne BIP (aussi appelée GRP78). Le stress du RE entraîne la dissociation de ces senseurs avec BIP permettant leur activation (**figure 11**).

La kinase PERK phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α conduisant à une réduction générale de la synthèse protéique afin de réduire la demande en repliement des protéines. La phosphorylation d'eIF2 α entraîne également une augmentation de la traduction du facteur de transcription ATF4 qui contrôle l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du statut redox, du métabolisme des acides aminés ainsi que de gènes codant pour des chaperonnes et des protéines permettant le repliement. ATF4 contrôle également l'expression de protéines pro-apoptotiques en particulier le facteur de transcription CHOP. PERK phosphoryle également le facteur de transcription Nrf2 qui va permettre la transcription de différents gènes impliqués dans un programme antioxydant. IRE-1 possède une activité kinase et une activité endoribonucléase. L'activation de cette dernière induit un splicing particulier de l'ARNm de XBP-1 (X-box-binding protein 1) permettant de générer une forme splicée de XBP1 (XBP1s) qui est un facteur de transcription permettant d'augmenter l'expression de plusieurs protéines chaperonne, de protéines de

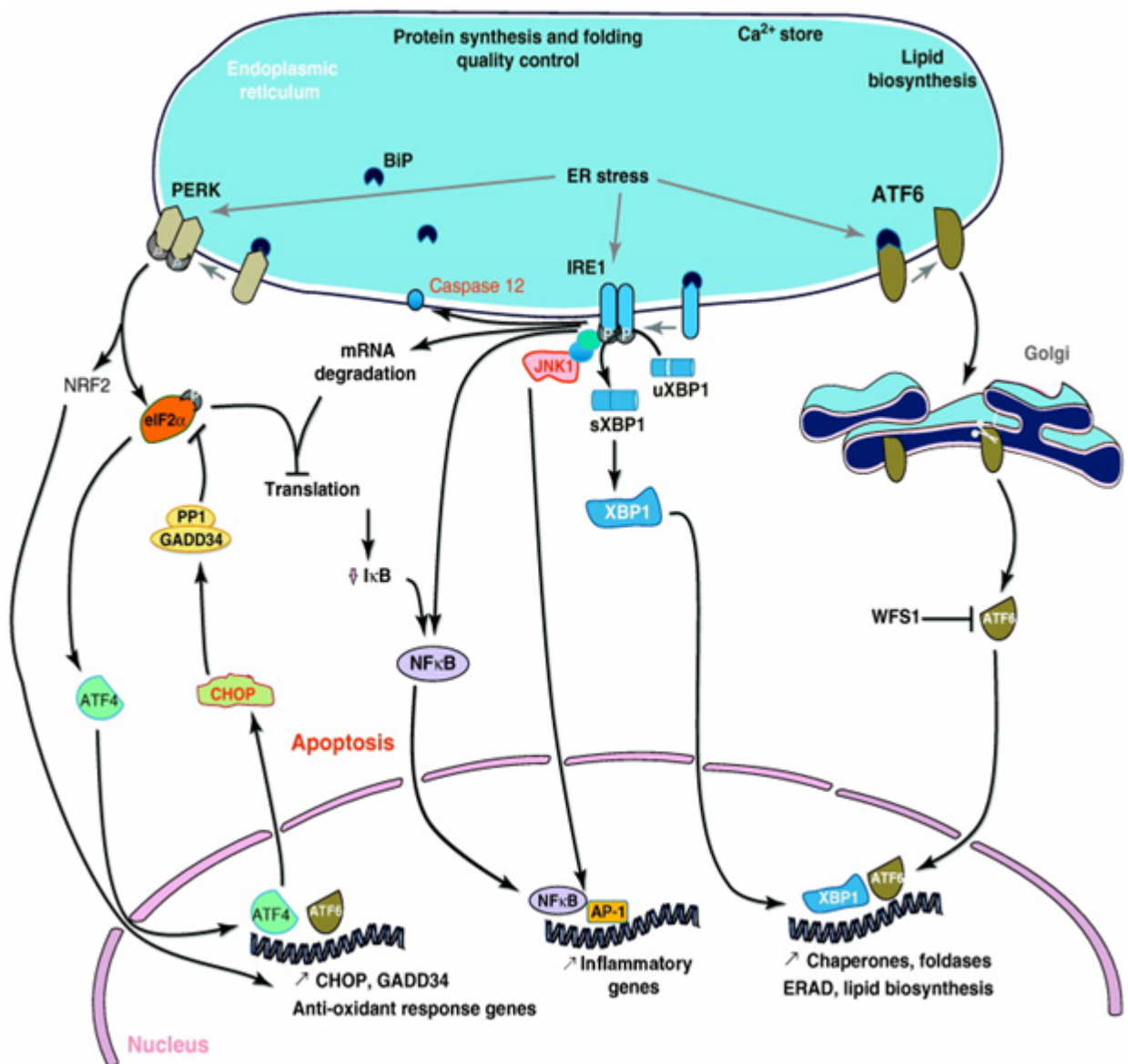


Figure 11 : Voies d'activation du stress du Réticulum endoplasmique (Cnop 2012)

Le stress du RE au travers de l'activation de ses trois voies de signalisation (IRE-1, PERK et ATF-6) participe au développement d'une réponse inflammatoire

l'ERAD ainsi que de protéines contrôlant la biosynthèse des lipides. IRE1 possède également une activité ARNase non spécifique qui dégrade les ARNms localisés à la membrane du RE. De plus IRE1 interagit avec TRAF2 (TNFR-associated factor-2) ce qui conduit à l'activation des kinases JNK (Cnop et al., 2011; Flamment et al., 2012 ; Gregor and Hotamisligil, 2011; Ozcan et al., 2004).

ATF-6 est un facteur de transcription maintenu en absence de stress dans la membrane du RE par BIP/GRP78. Un stress du RE entraîne la dissociation de ces deux protéines et la translocation d'ATF6 dans le Golgi où deux protéases (sit-1 and -2 protéases) vont la cliver partiellement générant une forme cytosolique qui transloque dans le noyau et augmente l'expression d'un certain nombre de protéines chaperonnes et de protéines permettant le repliement (Cnop et al., 2011; Flamment et al., 2012 ; Gregor and Hotamisligil, 2011; Ozcan et al., 2004).

Les travaux pionniers du groupe de Hotamisligil ont mis en évidence une augmentation du stress du RE et de l'UPR dans le foie et le tissu adipeux de souris obèses et ont démontré l'implication du stress du RE dans l'insulinorésistance (Ozcan et al., 2004). Un stress du RE a également été retrouvé dans le tissu adipeux de patients obèses avec en particulier, l'augmentation de phosphorylation d'EIF2 α , l'activation d'IRE1 et l'augmentation d'expression de la forme splicée d'XBP1 ainsi qu'une augmentation de l'expression de différentes chaperonnes contrôlées par ATF-6. La perte de poids après chirurgie bariatrique permet de diminuer l'expression des différents marqueurs de l'UPR suggérant une baisse du stress du RE (Gregor and Hotamisligil, 2007; Gregor et al., 2009). *In vitro*, différents inducteurs du stress du RE diminuent la signalisation insulinique adipocytaire. A l'inverse de nombreux facteurs impliqués dans l'insulinorésistance (acides gras saturés, glucose, LPS, hypoxie) induisent un stress du RE et activent l'UPR dans les adipocytes (Gregor and Hotamisligil, 2007).

La connexion entre stress du RE et insulinorésistance peut s'expliquer par différents mécanismes. Le stress du RE, *via* l'UPR, active différentes kinases dont JNK et IKK β qui interfèrent avec la signalisation insulinique en particulier en induisant la sérine phosphorylation des IRSs (Gual et al., 2005 ; Tanti and Jager, 2009). D'autre part, le stress du RE augmente la lipolyse et modifie le profil sécrétoire des adipokines. Ces changements pourraient contribuer au développement de l'inflammation du tissu adipeux *via* la diminution d'expression d'adipokines anti-inflammatoires comme l'adiponectine et en

augmentant la production d'adipokines ou cytokines pro-inflammatoires. Il existe en effet des connexions entre le stress du RE et l'activation de différentes voies de signalisation contrôlant la production de médiateurs inflammatoires. Ceci a été montré dans différents type cellulaires ou l'induction du stress du RE par des agents chimique comme la tunicamycine qui perturbe la glycosylation des protéines ou la thapsigargine qui inhibe les pompes calciques du RE, augmente la production de certaines cytokines (Gargalovic et al., 2006). Les trois branches de l'UPR sont potentiellement impliquées dans cette réponse inflammatoire. L'activation des kinases IKK et JNK par IRE1 entraîne une augmentation des facteurs pro-inflammatoires *via* les facteurs de transcription AP1 et NF- κ B. La forme splicée d'XBP1 a été impliquée dans la production de cytokines inflammatoires plus particulièrement au sein des macrophages. L'activation de PERK induit une diminution de l'expression d'I κ B α , un inhibiteur de NF- κ B. De plus, l'augmentation d'ATF4 suite à l'activation de PERK contribue également à la production de cytokines inflammatoires. Enfin, ATF6 augmente l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. Le stress du RE peut également être la source d'un stress oxydatif et d'apoptose, processus qui eux aussi peuvent déclencher une inflammation (Gregor and Hotamisligil, 2007). Inversement, l'inflammation et le stress oxydant peuvent induire un stress du RE créant ainsi des cercles vicieux qui perpétuent les anomalies métaboliques associés à l'obésité.

Ainsi, il est possible que l'inflammation du tissu adipeux associée à l'obésité soit au moins en partie la conséquence du développement d'un stress du RE dans le tissu adipeux. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que la réduction du stress du réticulum chez des souris obèses s'accompagne d'une diminution de l'inflammation du tissu adipeux (Kawasaki et al., 2012). De plus, *in vitro*, l'inflammation adipocytaire induite par les acides gras saturés est consécutive à une induction du stress du RE et à l'activation des kinases PERK et IKK β ainsi que de l'inflammasome NLRP3 (Jiao et al., 2011 ; Kim et al., 2013). Le développement d'un stress du RE dans les macrophages infiltrant le tissu adipeux obèse, pourrait également contribuer à l'inflammation de ce tissu. En effet, une accumulation de lipides ou de cholestérol dans les macrophages est connue pour induire un stress du RE et activer la réponse inflammatoire. Or, il a été montré que l'accumulation de lipides dans les macrophages du tissu adipeux contribue à leur polarisation vers un état pro-inflammatoire (Prieur et al., 2011).

Des approches thérapeutiques visant à diminuer le stress du RE pourrait donc constituer de nouvelles voies pour diminuer l'inflammation du tissu adipeux et l'insulinorésistance. Certaines chaperonnes chimiques comme le TUDCA (taurine-conjugated ursodeoxycholique acide) ou le PBA (l'acide 4-phenyl butyrique) protègent du stress du RE en favorisant le repliement de protéines. Le traitement de souris obèses avec ces chaperonnes améliore leur sensibilité à l'insuline et diminue l'hyperglycémie sans modifier leur obésité. Parallèlement, le stress du RE est diminué dans le tissu adipeux mais aussi dans le foie (Gregor and Hotamisligil, 2007; Ozcan et al., 2004).

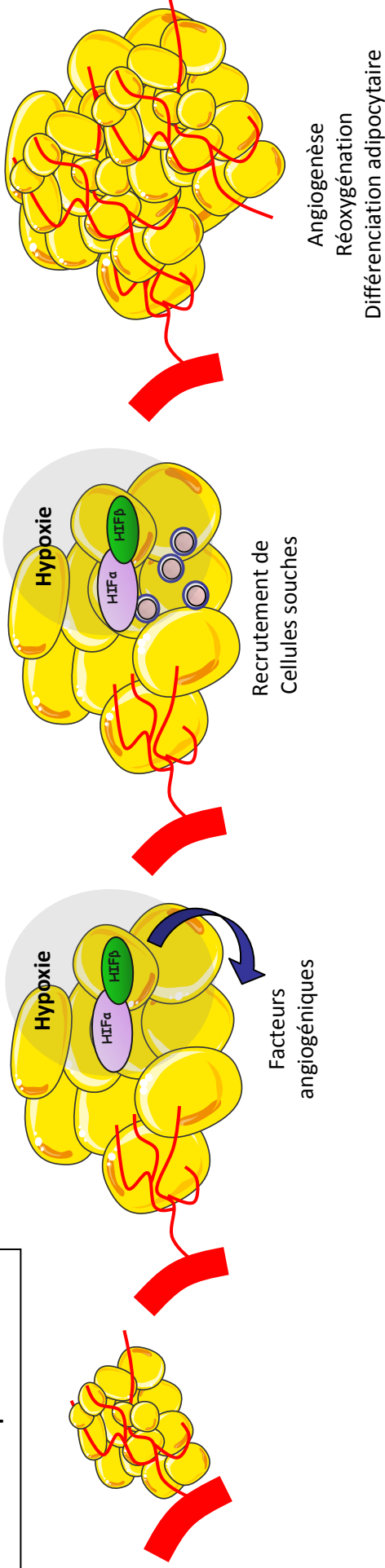
Bien que l'obésité engendre un stress du RE dans le tissu adipeux, il reste à démontrer son importance dans ce tissu par rapport aux autres tissus impliqués dans le contrôle de l'homéostasie gluco-lipidique. De même l'importance d'une réponse UPR soutenue dans les altérations du métabolisme des adipocytes et dans l'inflammation du tissu adipeux nécessite d'être mieux comprise.

II.2.3 Hypoxie et inflammation du tissu adipeux

Lors de l'obésité, le tissu adipeux subit une expansion importante résultant principalement de l'augmentation de la taille des adipocytes. Cette expansion s'accompagne de l'apparition de zones hypoxiques. Ce phénomène a été bien démontré dans le tissu adipeux de rongeurs soumis à une alimentation riche en graisse ou génétiquement obèse. Chez l'homme, le sujet fait débat car si initialement certaines études ont mis en évidence des zones hypoxiques dans le tissu adipeux de patients obèses, plus récemment ce concept a été remis en cause (Goossens et al., 2011; Hodson et al., 2013) (**figure 12**).

Plusieurs modifications dans le tissu adipeux obèse peuvent expliquer le développement de zones hypoxiques. La densité des capillaires est plus faible dans le tissu adipeux d'obèses et la largeur des vaisseaux plus importante suggérant une vascularisation moins efficace. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que les cellules endothéliales du tissu adipeux omental d'obèses sont dans un état de sénescence qui est associé à une augmentation de leur statut pro-inflammatoire (Villaret et al., 2010). Ainsi, une diminution des capacités angiogénique du tissu adipeux chez l'obèse ne permettrait pas une adaptation correcte à l'augmentation de sa taille, entraînant une baisse de son oxygénation et des défauts de différenciation des cellules souches précurseur des adipocytes. Ceci favoriserait la formation d'adipocytes hypertrophiques, qui avec un diamètre compris entre 150 et 200 µm, auraient

Expansion normale
Du tissu adipeux



Expansion pathologique
Du tissu adipeux

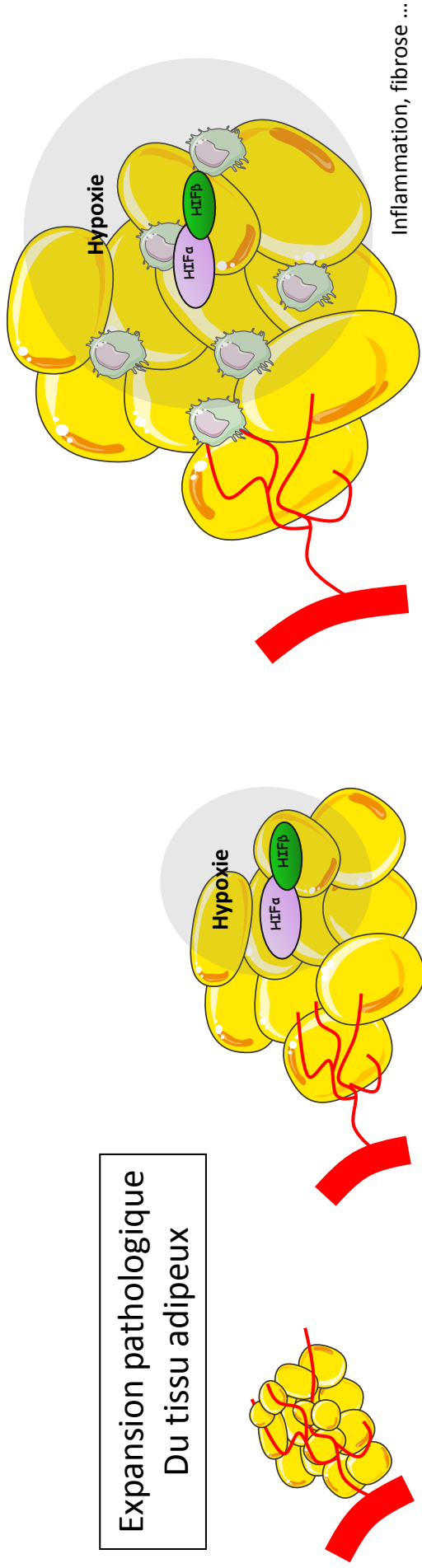


Figure 12 : Expansion du tissu adipeux et zones hypoxiques

L'expansion du tissu adipeux chez les individus obèses aboutit à l'apparition de zones hypoxiques qui vont être mal re-vascularisées. Le recrutement des cellules immunitaires dans ces zones hypoxiques va participer à la mise en place d'une inflammation.

une taille incompatible avec la distance de diffusion de l'oxygène. De plus, il a été montré que l'augmentation du flux sanguin vers le tissu adipeux après un repas est moindre chez les sujets ou les souris obèses et cela pourrait contribuer également au développement des zones hypoxiques. Des modifications de la fonction des organelles adipocytaires induites par les nutriments pourraient également conduire à une hypoxie cellulaire relative. Ainsi, il a été montré récemment que les acides gras saturés induisent dans les mitochondries des adipocytes, l'expression d'ANT2 (adénine nucléotide translocase 2). Cette translocase située dans la membrane interne des mitochondries augmente le découplage de la respiration mitochondriale provoquant un accroissement de la consommation d'oxygène et une hypoxie intracellulaire relative (Lee et al., 2014).

La réponse à l'hypoxie est régulée en majorité par le facteur de transcription HIF (Hypoxia Inductible Factor). Il s'agit d'un hétérodimère constitué d'une sous-unité α et d'une sous-unité β constitutivement présente. Il existe trois isoformes : HIF1 qui est ubiquitaire, HIF2 et HIF3 qui ont une expression dépendante du type cellulaire. HIF 1, la forme la plus étudiée, et s'accumule uniquement lors d'une hypoxie sévère (Wiesener et al., 1998). En conditions normoxiques, les protéines α sont très peu détectées puisqu'elles sont hydroxylées par des prolyl hydroxylases et rapidement dégradées par le protéasome (Moroz et al., 2009). La principale régulation de HIF par l'oxygène s'effectue au niveau de la stabilité de la sous-unité α qui est l'élément principal responsable de l'augmentation de HIF en hypoxie, mais il semble que l'hypoxie induise également la transcription de son ARNm (**figure 13A**).

L'hypoxie du tissu adipeux pourrait être impliquée dans son inflammation comme le suggère plusieurs études. En effet, une hypoxie expérimentale induit *in vitro* des modifications de la sécrétion des adipokines avec notamment la baisse d'adipokines anti-inflammatoires comme l'adiponectine et l'augmentation d'adipokines pro-inflammatoires comme la leptine (**figure 13B**) (Kunduzova et al., 2008 ; Ye, 2009). L'hypoxie induit également la production de différentes cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et le TGF β par les adipocytes ou les macrophages (Ye et al., 2007). L'augmentation de la production des cytokines provient principalement de la régulation de l'activité de NF- κ B et C/EBP par l'hypoxie (Teng et al., 2002). D'autre part, les voies de stress des MAP kinases sont activées en réponse à l'hypoxie dans le tissu adipeux et participent à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux (O'Rourke et al., 2011). Le MCP-1 est aussi augmenté lors de l'hypoxie suggérant que l'hypoxie pourrait participer à

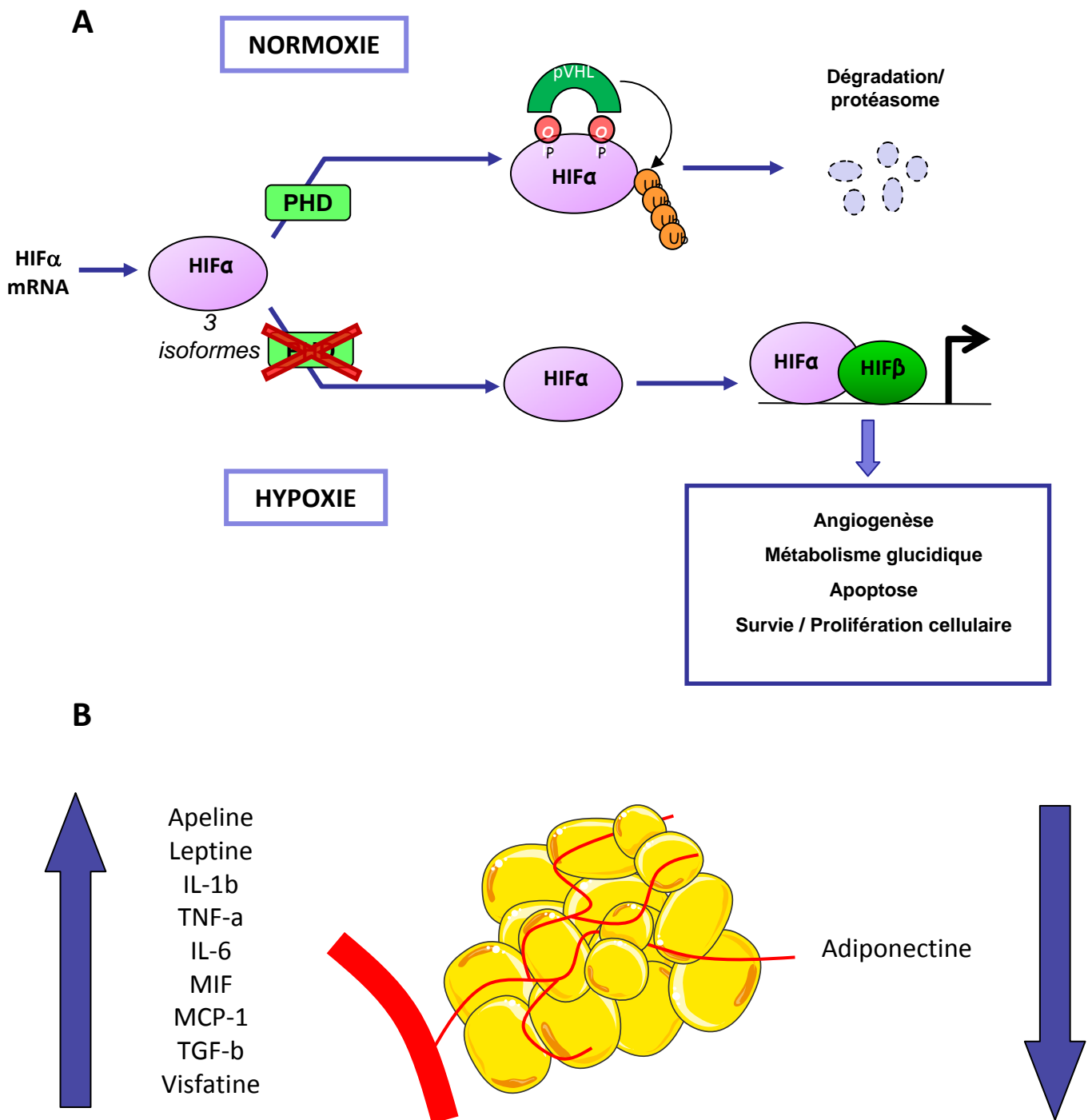


Figure 13 : Régulation de la stabilisation de HIF et de l'expression de certaines adipokines par l'hypoxie

- (A) En conditions de normoxie la sous-unité α de HIF est dégradée par le protéasome, lors de l'hypoxie cette sous-unité est stabilisée et s'associe avec la sous-unité β permettant ainsi la régulation de nombreux gènes impliqués dans différents processus cellulaires
- (B) L'hypoxie est associée à une dérégulation de sécrétions de certaines adipokines.

l'infiltration du tissu adipeux par les macrophages. En accord avec cette hypothèse, il a été montré par immuno-marquage que les zones hypoxiques du tissu adipeux sont riches en cellules immunitaires (Rausch et al., 2008) et que les marqueurs qui caractérisent les macrophages du tissu adipeux sont inversement corrélés à la pression partielle en oxygène chez l'homme (Pasarica et al., 2009). Ces cellules immunitaires recrutées dans les zones hypoxiques pourraient contribuer à la réaction inflammatoire mais aussi au remodelage du tissu adipeux et à son adaptation à l'hypoxie. En effet, les macrophages présents dans les zones hypoxiques du tissu adipeux pourraient faciliter la néo-vascularisation *via* la sécrétion de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et de PDG (Platelet Derived Growth Factor) (Cho et al., 2007 ; Pang et al., 2008).

L'hypoxie du tissu adipeux *via* l'induction d'HIF-1 α contribue également à la régulation de nombreux gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire participant ainsi au développement de la fibrose du tissu adipeux. L'inflammation du tissu adipeux causée par l'hypoxie pourrait aggraver ce processus de fibrose qui contribue in fine aux dysfonctions du tissu adipeux et au développement de l'insulinorésistance (Sun et al., 2013).

L'ensemble des études actuelles suggère donc que l'hypoxie en modulant le microenvironnement des adipocytes pourrait être un facteur important dans l'inflammation et la dysfonction du tissu adipeux contribuant ainsi à l'insulinorésistance. L'hypoxie pourrait également directement perturber les fonctions des adipocytes en augmentant le stress oxydant ou du réticulum endoplasmique (Trayhurn, 2013) ainsi qu'en altérant la capacité de l'insuline à activer sa voie de signalisation *via* un mécanisme dépendant de HIF-1 α et des modifications de la structure des cavéoles (Regazzetti et al., 2009).

II.2.4 Modification du microbiote intestinal et inflammation du tissu adipeux

L'étude du microbiote intestinal et son influence dans l'obésité est un domaine de recherche en plein extension. L'interaction entre la flore intestinale et l'hôte peut affecter la prise de poids, la sensibilité à l'insuline et l'état inflammatoire de différents tissus dont le tissu adipeux. Le système immunitaire est sans doute à l'interface entre les modifications de la flore intestinale et les modifications du métabolisme.

Le tractus gastro-intestinal abrite entre 10¹³⁻¹⁴ bactéries soit environ 10 fois le nombre de cellules de notre organisme. De même la diversité du génome des bactéries intestinales, le

metagénome, est 200 fois supérieur à celui du génome humain. La colonisation de l'intestin par les bactéries débute rapidement après la naissance par l'acquisition par le nouveau-né des bactéries de sa mère et de l'environnement proche. Cette colonisation est cruciale pour « éduquer » le système immunitaire et pour le contrôle de différentes fonctions physiologiques importantes. L'impact du microbiote sur le système immunitaire et la physiologie de l'hôte est illustré par les anomalies observées chez des souris axéniques c'est à dire dépourvues de microbiote.

Les expériences princeps permettant de suggérer une causalité entre modification du microbiote et développement de l'obésité et de l'insulinorésistance ont été réalisées par le groupe de Gordon, il y a dix ans. Il a été démontré que des souris axéniques soumises à un régime riche en graisses grossissaient moins que des souris conventionnelles (possédant un microbiote) soumises au même régime (Backhed et al., 2004). Une avancée importante dans la démonstration d'une causalité entre flore intestinale et développement de l'obésité et de ses complications a été ensuite la démonstration par ce même groupe que des souris axéniques colonisées par une flore provenant de souris obèses gagnaient plus de poids que des souris axéniques colonisées avec une flore provenant de souris minces (Turnbaugh et al., 2006). Ceci s'expliquant par des différences dans la composition du microbiote intestinal entre les souris minces et obèses. Ces modifications ont été ensuite retrouvées chez des patients obèses. En particulier, la proportion de deux types de bactéries intestinales, les *Bacteroides* et les *Firmicutes*, est modifiée chez les obèses avec une diminution relative en *Bacteroides* comparé au *Firmicutes* et ces modifications corrélaient avec l'augmentation de marqueurs pro-inflammatoires (Burcelin et al., 2012; Furet et al., 2010 ; Ley et al., 2005 ; Ley et al., 2006). Les modifications de flore intestinale sont influencées par la composition du régime alimentaire. Un régime riche en graisses ou en sucres va perturber la composition de la flore favorisant l'apparition d'une flore qui est délétère pour l'homéostasie métabolique de l'hôte. A l'inverse, une alimentation riche en prébiotiques comme certaines fibres ou en probiotiques ainsi que la perte de poids a un effet favorable sur la composition du microbiote intestinal.

De nombreuses évidences se sont ainsi accumulées durant ces dernières années en faveur d'un rôle important de modifications de la flore intestinale (dysbiose intestinale) dans le développement de l'inflammation métabolique. Un mécanisme important est une modification de la perméabilité intestinale chez l'obèse associée au changement de flore

intestinale qui facilite le passage de composés pro-inflammatoires de la paroi bactérienne comme le LPS ou les peptidoglycans. Ces composés vont être reconnus par les systèmes de détections des pathogènes tels que les TLR-2 et -4 et les NODs présents sur les cellules immunitaires mais aussi sur certaines cellules métaboliques dont les adipocytes. L'activation des TLRs et des NODs va conduire à une augmentation de production de cytokines inflammatoires (Burcelin et al., 2012).

Les premières évidences à la base de ce concept proviennent de la démonstration par Patrice Cani et Remy Burcelin que les taux circulants de LPS sont modérément élevés chez des souris obèses comparés à des souris minces, phénomène qui a été décrit sous le nom d'endotoxémie métabolique. Une infusion de LPS à des souris minces afin d'augmenter les taux circulants pour être physiologiquement proche de ceux observés chez les obèses permettait d'induire une insulino-résistance et une prise de poids démontrant le rôle causal de cette endotoxémie métabolique (Cani et al., 2007). A l'inverse, le traitement de souris obèses avec des antibiotiques aboutit à une diminution des niveaux du LPS et de l'expression du TNF α dans l'intestin, ce qui s'accompagne d'une diminution du poids et des taux d'insuline dans le sérum et d'une amélioration de la tolérance au glucose (Cani et al., 2008 ; Membrez et al., 2008). Cette endotoxémie métabolique a été retrouvée chez des personnes à risque de développer des maladies métaboliques en particulier ceux consommant une alimentation riche en graisses (Amar et al., 2008 ; Laugerette et al., 2011). Il existe un lien entre LPS et lipides alimentaires intestinaux qui pourrait expliquer cette observation. En effet, l'absorption de LPS est facilitée par les chylomicrons et ils circulent dans le sang associés à différentes protéines de liaison mais aussi à des lipoprotéines. En condition physiologique les taux circulants de LPS augmentent modérément dans la circulation puis diminuent en période post-absorptive. En conséquence, une alimentation riche en lipides favorise l'absorption du LPS et son transport vers différents tissus dont le tissu adipeux.

Très récemment est apparu également le concept que des modifications du microbiote tissulaire (bactéries vivantes ou mortes résident dans les tissus) pourraient également contribuer à l'inflammation et aux dysfonctions du tissu adipeux et au développement du diabète de type 2 (Amar et al., 2011a ; Amar et al., 2011b; Burcelin et al., 2013).

Les modifications du microbiote qu'il soit intestinal ou tissulaire apparaissent donc comme des facteurs importants dans le développement de l'inflammation métabolique et des complications de l'obésité. Toutes les études démontrent des relations complexes entre

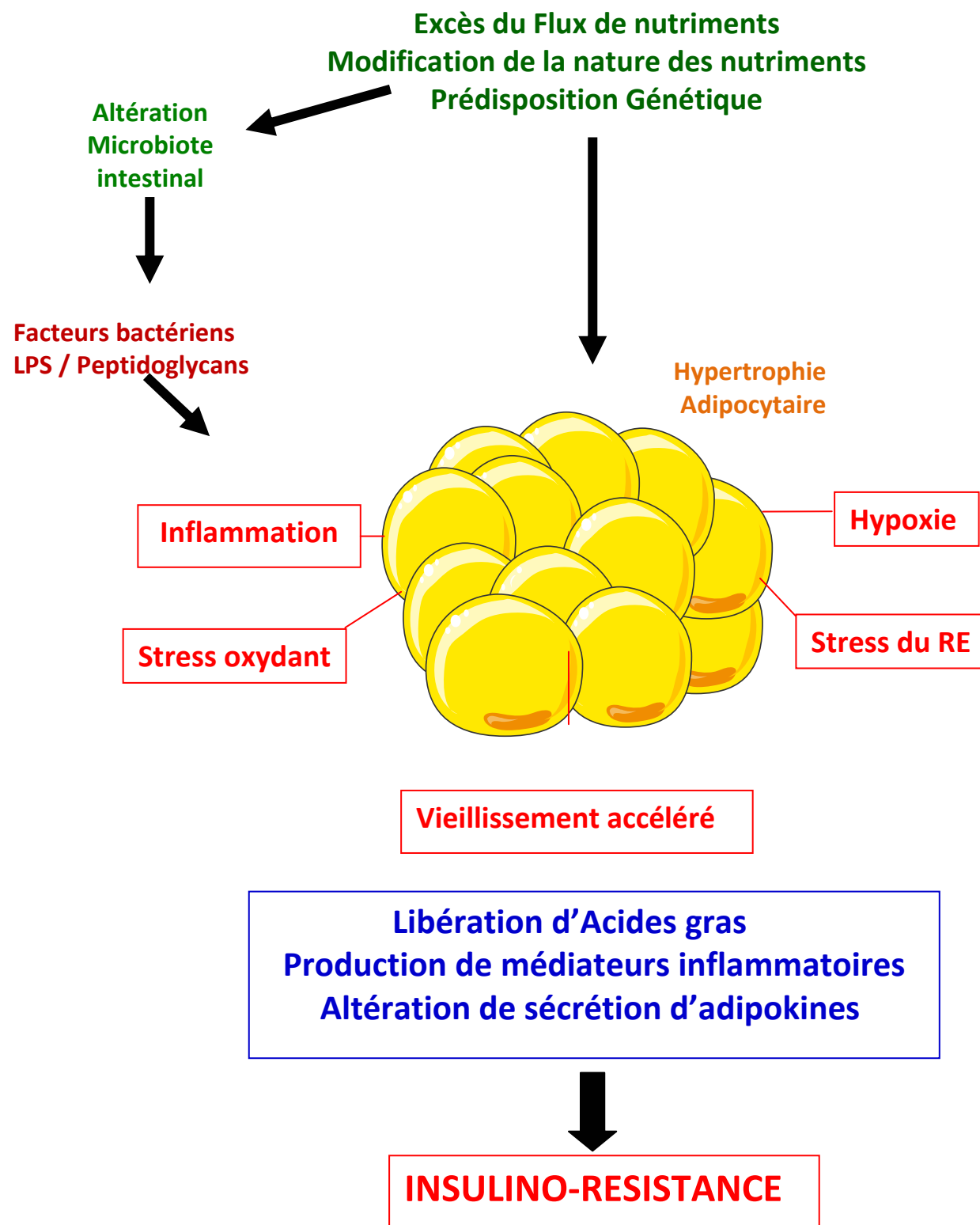


Figure 14 : La dysfonction du tissu adipeux est impliquée dans le développement de l'insulino-résistance

La modification et l'augmentation du flux de nutriments associées aux prédispositions génétiques participent au dysfonctionnement du tissu adipeux, ayant pour conséquences une augmentation de la libération de facteurs inflammatoires et le développement d'une insulino-résistance.

microbiote, environnement et génétique de l'hôte et placent des altérations du dialogue entre système immunitaire de l'hôte et microbiote comme des éléments importants dans le développement de l'inflammation métabolique associée à l'obésité. Ainsi, si comme discuté précédemment des modifications du microbiote conduit à une augmentation de la réponse immunitaire et inflammatoire, à l'inverse des modifications de la réponse immunitaire peuvent entraîner des modifications du microbiote. Cela est illustré par exemple par l'étude de souris déficientes pour le TLR5, un TLR très exprimé dans la muqueuse intestinale et impliquée dans la reconnaissance de la flagelline des bactéries. Ces souris ont des modifications du microbiote intestinal et développe spontanément une obésité et des désordres métaboliques. Le transfert de ce microbiote à des souris axéniques induit le développement de désordres métaboliques chez ces souris.

Des interventions nutritionnelles ou thérapeutiques visant à prévenir ou à corriger les anomalies de compositions du microbiote pourraient donc constituer dans le futur de nouvelles approches contre les complications de l'obésité.

II.3 Médiateurs cellulaires de l'inflammation du tissu adipeux

II.3.1 Adipocytes et inflammation du tissu adipeux

Des modifications de la fonction endocrine des adipocytes ainsi qu'une augmentation de la libération d'acides gras pourraient être des événements précoces dans le développement de l'inflammation du tissu adipeux. Les différents stress (stress du réticulum, stress oxydant, stress hypoxique) induits par l'excès de nutriments surtout les acides gras au sein des adipocytes, en particulier au sein des adipocytes hypertrophiques, vont activer différentes voies inflammatoires (JNK, ERK, IKK, PKR, TLR, NOD, NLRP3) (**Figure 14**). Les produits bactériens issus des modifications de la flore intestinale pourraient également activer ces voies inflammatoires. La fonction endocrine du tissu adipeux va ainsi être perturbée avec l'augmentation de cytokines pro-inflammatoire comme la leptine ou RBP4 (retinol binding protein 4) alors que la sécrétion d'autres adipokines anti-inflammatoires et insulino-sensibilisatrices comme l'adiponectine est diminué. Certaines cytokines inflammatoires en particulier l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6 ainsi que des leucotriènes (Mothe-Satney et al., 2012) et des prostaglandines sont produites par les adipocytes en réponse à l'activation de ces voies

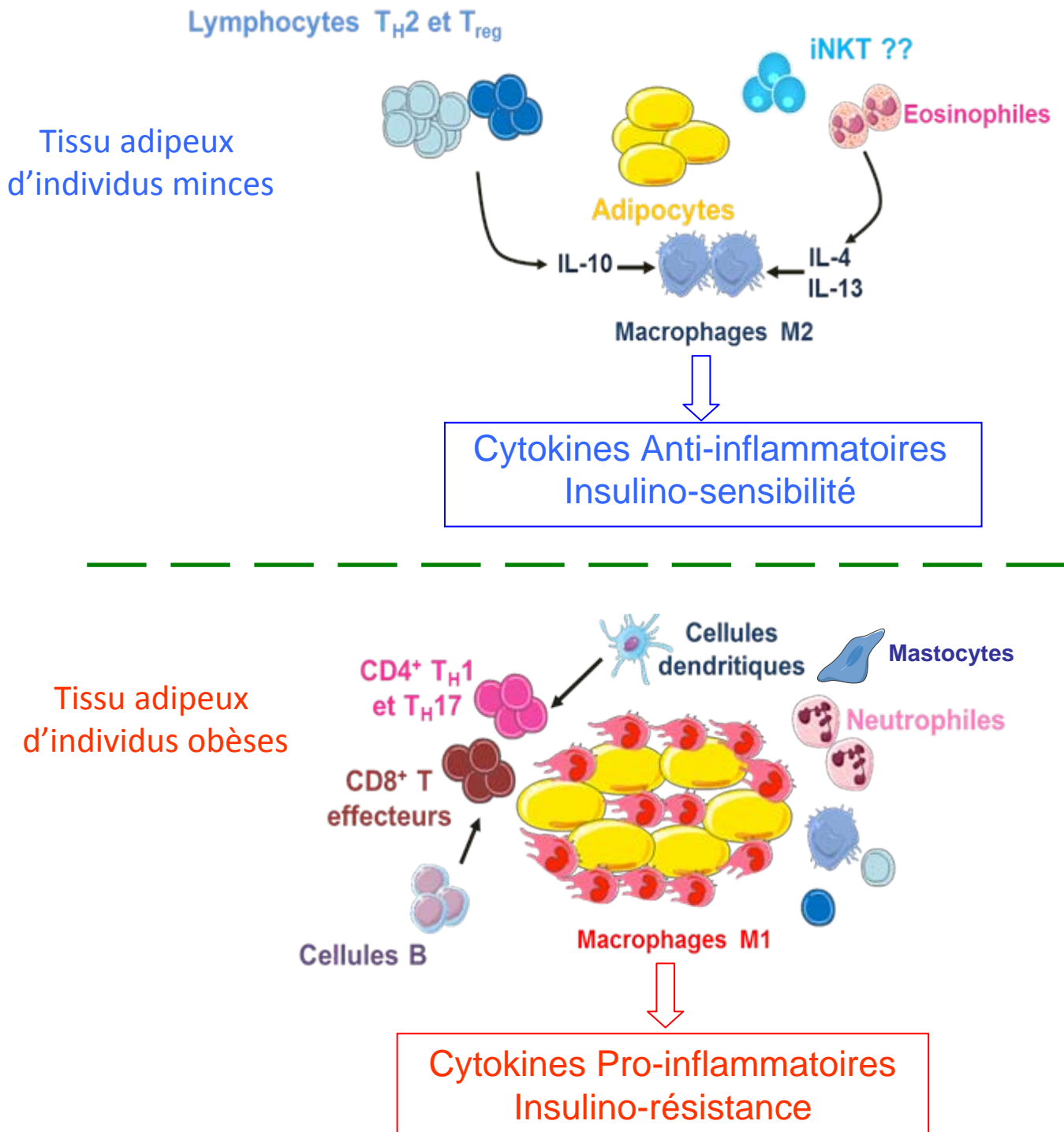


Figure 15 : Modification des populations de cellules immunitaires dans le tissu adipeux lors de l'obésité

Le tissu adipeux d'individus minces est composé de cellules immunitaires principalement orientées vers un profil anti-inflammatoire qui permettent le bon fonctionnement de ce tissu. Lors de l'obésité le tissu adipeux fait l'objet de l'infiltration de cellules immunitaires de type pro-inflammatoires participant à la mise en place de l'inflammation du tissu et à son dysfonctionnement

inflammatoires. Certaines chimiokines en particulier CCL2 (MCP-1), capables d'attirer les macrophages dans le tissu adipeux, sont également produites par les adipocytes. Ces modifications de sécrétions couplées à une augmentation de la mort des adipocytes hypertrophiques pourraient induire le recrutement de cellules immunitaires dans le tissu. L'activation de ces cellules immunitaires va amplifier et maintenir la réaction inflammatoire perturbant encore plus les fonctions métaboliques des adipocytes.

Ce scénario place les adipocytes comme les initiateurs de la réponse inflammatoire mais la propagation de cette inflammation est pour beaucoup la conséquence de l'accumulation et de la modification des cellules immunitaires dans le tissu adipeux obèse (**Figure 15**).

II.3.2 Les macrophages du tissu adipeux

II.3.2.1 Polarisation des macrophages, inflammation du tissu adipeux et insulino-résistance

Au début des années 2000, les travaux pionniers de Xu et Weisberg ont démontré que le tissu adipeux de souris obèses était infiltré par des macrophages et que la majorité des cytokines inflammatoires produites dans le tissu obèse provenait de ces macrophages (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). De nombreuses études ont par la suite confirmé l'importance de ces cellules dans la production de cytokines inflammatoires et l'insulino-résistance (Lolmede et al., 2011; McNelis and Olefsky, 2014).

Des macrophages sont en fait présents aussi bien dans le tissu adipeux de souris ou de patients obèses que dans celui de souris ou d'individus minces. Cependant, leur prévalence augmente lorsque le tissu adipeux se développe et cette prévalence corrèle positivement avec l'IMC et l'hypertrophie adipocytaire (Vieira-Potter, 2014). Ainsi il a été estimé que 10% des cellules de la fraction stroma vasculaire d'un tissu adipeux mince correspond à des macrophages alors que cette proportion atteint les 40-50 % chez l'obèse (McNelis and Olefsky, 2014). Une caractéristique importante des macrophages du tissu adipeux obèse est qu'ils sont dans un état pro-inflammatoire supérieur à celui observé dans le tissu adipeux de souris ou de patients minces. En effet, les macrophages, définis en cytométrie de flux comme des cellules CD11b+ et F4/80+ peuvent avoir différentes polarisations, de type anti-inflammatoires désignée M2 ou pro-inflammatoires désignée M1. Au sein du tissu adipeux d'individus et de souris minces, on retrouve des macrophages résidents dispersés dans l'ensemble du tissu et de polarisation principalement M2 caractérisée par l'expression de

gènes spécifique tels que le CD206 (récepteur du mannose), le CD163 (cluster de différenciation 163), l'arginase 1, Ym1 et produisant des cytokines majoritairement anti-inflammatoires, la principale étant l'IL-10. Ces macrophages pourraient jouer un rôle important dans le remodelage du tissu adipeux et son expansion (Lee et al., 2013b)

Au sein du tissu adipeux d'individus obèses, les macrophages recrutés se retrouvent principalement sous forme de couronne autour d'adipocytes hypertrophiques présentant de nombreuses anomalies structurales et exprimant des marqueurs de morts cellulaires principalement de pyroptose (Cinti et al., 2005; Giordano et al., 2013). L'obésité augmente le nombre de ces macrophages de type M1 qui expriment le marqueur CD11c en plus des marqueurs CD11b et F4/80 et secrètent des cytokines inflammatoires comme le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-1 β , IL-6 (Lumeng et al., 2007a; Lumeng et al., 2008 ; McNelis and Olefsky, 2014; Nguyen et al., 2007a) impliquées dans les altérations de la signalisation insulinaire et l'insulinorésistance (Jager et al., 2007 ; Tanti and Jager, 2009). Par contre la population de macrophage $\text{CD11b}^+ \text{F4/80}^+ \text{CD11c}^-$ demeure inchangée dans le tissu adipeux lors de l'obésité (Shaul et al., 2010).

Plusieurs facteurs contrôlent la polarisation des macrophages et des différences d'expression de ces facteurs entre tissu adipeux d'obèses et d'individus ou de souris minces pourraient expliquer la différence de polarisation. La polarisation M2 est sous la dépendance de l'IL-4 qui est très exprimée dans le tissu adipeux mince (Wu et al., 2011). De même l'adiponectine favorise la polarisation M2 et sa sécrétion est diminuée dans le tissu adipeux d'obèses (Ohashi et al., 2010). A l'inverse, le LPS, l'hypoxie et différentes cytokines ou adipokines pro-inflammatoire pourraient favoriser la polarisation M1. Les acides gras en s'accumulant dans les macrophages du tissu adipeux et/ou en interagissant avec les TLR4 des macrophages favorisent également la polarisation M1 (Prieur et al., 2011 ; Shi et al., 2006a). Au niveau moléculaire, les facteurs de transcription $\text{PPAR}\gamma$ et $\text{PPAR}\beta/\delta$ contrôlent positivement la polarisation M2. L'inactivation de $\text{PPAR}\gamma$ ou $\text{PPAR}\beta/\delta$ spécifiquement dans les cellules myéloïdes réduit la polarisation M2 et favorise le développement de l'obésité et /ou de l'insulinorésistance de souris soumises à un régime riche en graisses (Kang et al., 2008; Odegaard et al., 2007). Le traitement de souris sous régime riche en lipides avec de la rosiglitazone (un agoniste de $\text{PPAR}\gamma$) entraîne une repolarisation des macrophages du tissu adipeux vers un profil M2 (Stienstra et al., 2008). Les cytokines telles que l'IL-13 et l'IL-4

participe à l'activation de PPAR β/δ des monocytes permettant leur différenciation en macrophages de phénotype M2 (Kang et al., 2008).

Ainsi, l'hypothèse la plus probable pour expliquer l'augmentation des macrophages de type M1 dans le tissu adipeux, serait le recrutement de monocytes depuis la circulation et leur polarisation préférentielle vers le phénotype M1 par des facteurs localement produits dans le tissu adipeux obèse. Par contre les facteurs produits dans le tissu adipeux mince assureraient plutôt un maintien d'un phénotype M2. Cependant ce scénario est encore débattu. En effet, bien que la classification M1 et M2 soit couramment employée pour distinguer les populations de macrophages, celle-ci est simpliste et les macrophages dans un tissu donné forment souvent des populations hétérogènes exprimant à la fois des marqueurs pro- et anti-inflammatoires. Le phénotypage de plus en plus précis des macrophages du tissu adipeux a montré que ceux-ci, en particulier chez l'homme, ont souvent un phénotype mixte exprimant à la fois des marqueurs de type M1 et de type M2 et produisant des cytokines pro- et anti-inflammatoire (Bourlier and Bouloumie, 2009 ; Lolmede et al., 2011 ; Zeyda et al., 2007). De même, chez la souris obèse la perte de poids ne modifie pas le nombre de macrophages CD11c⁺ dans le tissu adipeux. Cependant ces cellules se mettent à exprimer des marqueurs anti-inflammatoires alors qu'elles exprimaient des marqueurs pro-inflammatoires dans le tissu adipeux obèse (Li et al., 2010). A l'inverse une autre étude démontre que la perte de poids qui s'accompagne d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline, induit une diminution de la proportion de macrophages dans le tissu adipeux (Cancello and Clement, 2006). Enfin une récente étude suggère que c'est une augmentation globale de la population de macrophages plutôt qu'un changement qualitatif qui explique l'augmentation des cytokines inflammatoires dans le tissu adipeux obèse par rapport au mince (Xu et al., 2013).

Même si la classification des macrophages du tissu adipeux n'est pas aussi simple qu'initialement décrite, de nombreuses évidences basées principalement sur des modèles de souris génétiquement modifiées indiquent qu'un état pro-inflammatoire du tissu adipeux médié par les macrophages contribue aux dysfonctions du tissu adipeux et au développement de l'insulinorésistance (McNelis and Olefsky, 2014). Par exemple, l'ablation des cellules CD11c⁺ ou des macrophages du tissu adipeux améliorent l'insulinorésistance de souris obèses (Bu et al., 2013 ; Feng et al., ; Patsouris et al., 2008). Le phénotype des souris avec une invalidation spécifique de PPAR γ ou PPAR β/δ dans les cellules myéloïdes conforte

également l'importance des macrophages pro-inflammatoires dans le développement de l'insulinorésistance (Kang et al., 2008; Odegaard et al., 2007).

Il est probable que la dysfonction du tissu adipeux induit par la présence des macrophages pro-inflammatoires soit la conséquence d'un « dialogue » paracrine avec les adipocytes ainsi que d'autres cellules de la fraction stroma-vasculaire. Il a été ainsi montré *in vitro* par des expériences de co-culture que des facteurs pro-inflammatoires sécrétés par les macrophages augmentent la lipolyse et que en retour les acides gras produits par les adipocytes avaient un effet pro-inflammatoire sur les macrophages, cet effet est d'autant plus marqué que les adipocytes sont gros (Suganami et al., 2005). Une co-culture entre adipocytes et macrophages induit également une diminution de la signalisation et des effets métabolique de l'insuline dans les adipocytes (Lumeng et al., 2007b). Cette boucle paracrine, si elle existe *in vivo*, pourrait contribuer au maintien et à l'aggravation de l'insulinorésistance. La présence de macrophages autour d'adipocytes présentant des marqueurs de mort cellulaire (Giordano et al., 2013) suggère également que les macrophages contribuent à l'élimination des lipides, des protéines et des autres débris cellulaires relargués par ces adipocytes. Les macrophages altèrent les capacités de prolifération et/ou de différenciation des progéniteurs adipocytaires et des préadipocytes présent dans la fraction stroma-vasculaire ce qui pourrait favoriser l'hypertrophie adipocytaire (Bourlier et al., 2008 ; Lacasa et al., 2007 ; Zaragosi et al., 2010). Ils modifient également dans ces cellules progénitrices l'expression de différentes protéines de la matrice extracellulaire contribuant potentiellement au développement de la fibrose du tissu adipeux observé chez les obèses (Keophiphath et al., 2009 ; Sun et al., 2013).

Il a été récemment montré que les macrophages pourraient également jouer un rôle important dans la gestion des flux de lipides à l'intérieur du tissu adipeux en catabolisant les lipides ou en séquestrant l'excès de lipides (Aouadi et al., 2014; Xu et al., 2013). Cette fonction nouvellement mise en évidence suggère que les macrophages dans le tissu adipeux d'obèse pourraient ne pas avoir qu'un rôle délétère mais également avoir un rôle protecteur contre les effets néfastes de l'excès de lipides.

II.3.3.2 Facteurs impliqués dans l'augmentation des macrophages du tissu adipeux lors de l'obésité

L'augmentation des macrophages du tissu adipeux est due principalement à un recrutement de monocytes circulants même si une récente étude indique qu'une prolifération *in situ* pourraient également contribuer à cette augmentation lors de l'obésité (Amano et al., 2014). Dans ce contexte de nombreuses études ont permis d'identifier les facteurs jouant un rôle dans ce recrutement des monocytes. Certains de ces facteurs chimioattractants identifiés sont sécrétés par les adipocytes et pourraient initier le recrutement des monocytes qui après leur différenciation en macrophages pro-inflammatoires pourraient également sécréter des facteurs chimioattractants amplifiant ainsi le phénomène de recrutement (McNelis and Olefsky, 2014). Parmi ces facteurs de nombreuses chimiokines ont été identifiées comme jouant un rôle dans le recrutement des monocytes au sein du tissu adipeux. Les chimiokines sont des cytokines qui stimulent le recrutement des cellules immunitaires sur un site inflammatoire. Jusqu'à présent plus de 50 chimiokines ont été identifiées et regroupées en quatre groupes selon la position des résidus cystéines conservés, CL, CX3CL, CXCL, et CCL (Zlotnik et al., 2006). Plusieurs d'entre elles sont plus exprimées dans le tissu adipeux d'obèse, nous discuterons ici plus particulièrement celles dont des évidences indiquent qu'elles participent ou celles qui n'ont aucune implication dans l'attraction des macrophages dans le tissu adipeux.

Le groupe des **CCLs** est le plus abondant avec 28 membres. Le rôle de CCL2 aussi appelé MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) et de son récepteur CCR2 dans le recrutement des monocytes au sein du tissu adipeux a été le mieux caractérisé. L'expression et la sécrétion de CCL2 est augmentée dans ce tissu lors de l'obésité dans différents modèles de souris obèses et chez l'homme et les adipocytes contribuent à cette augmentation (Chen et al., 2005 ; Christiansen et al., 2005; Dahlman et al., 2005 ; Kim et al., 2006 ; Yu et al., 2006). Un polymorphisme dans le gène codant pour CCL2 a été identifié dans la population Japonaise comme associé avec des taux circulants augmentés de CCL2. Les taux circulants de CCL2 étaient positivement corrélés avec l'obésité viscérale et l'insulinorésistance. De plus, dans un sous-groupe de patients obèses et diabétiques de type 2 de cette population, la présence de l'allèle à risque est associée à des taux de MCP-1 et une insulinorésistance plus élevés (Kouyama et al., 2007).

L'importance du couple CCL2/CCR2 dans le recrutement des macrophages du tissu adipeux a été démontrée par l'étude de différents modèles de souris génétiquement modifiées. La surexpression de CCL2 dans le tissu adipeux sous le contrôle du promoteur AP2 est suffisante pour augmenter l'infiltration des macrophages et l'inflammation et pour induire une insulino-résistance (Kamei et al., 2006; Kanda et al., 2006). L'invalidation de CCL2 ou de CCR2 ainsi que l'inhibition pharmacologique de CCR2 diminue l'infiltration macrophagique du tissu adipeux et l'insulino-résistance (Kanda et al., 2006 ; Sullivan et al., 2013; Tamura et al., 2010 ; Tamura et al., 2008 ; Weisberg et al., 2006). Cependant d'autres études n'ont pas démontré un effet bénéfique de l'invalidation de CCL2 ou de CCR2 (Chen et al., 2005 ; Inouye et al., 2007). Ces résultats contradictoires suggèrent que le recrutement des macrophages dans le tissu adipeux est un mécanisme complexe et que plusieurs chimiokines pourraient agir de concert pour promouvoir ce recrutement.

Parmi celles-ci, CCL3 (MIP-1 α) et CCL5 (Rantes) ont une expression augmentée lors de l'obésité (Huber et al., 2008 ; Keophiphath et al., 2010 ; Wu et al., 2007). Cependant, l'invalidation de CCL3 ne modifie pas l'infiltration des monocytes dans le tissu adipeux de souris rendues obèses par un régime riche en graisses (Surmi et al., 2010). CCL5, *in vitro*, favorise l'adhésion et la transmigration de monocytes au travers des cellules endothéliales et protège les macrophages de l'apoptose induite par le cholestérol (Keophiphath et al., 2010). Néanmoins l'importance de cette chimiokine *in vivo* reste à démontrer. Ces deux chimiokines pourraient avoir des rôles redondants car elles partagent les mêmes récepteurs CCR1 et CCR5 expliquant pourquoi l'invalidation de CCL3 n'a pas d'effet marqué. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que les macrophages du tissu adipeux d'obèses expriment fortement CCR5 et que son invalidation globale ou restreinte aux cellules hématopoïétiques protège de l'insulino-résistance à la fois en réduisant le nombre de macrophages du tissu adipeux et en favorisant leur polarisation de type M2 (Kitade et al., 2012).

La fractalkine ou CX3CL1 est l'unique membre connu de la famille des chimiokines CX3CL. Elle se fixe sur son récepteur CX3CR1. Son expression est augmentée dans le tissu adipeux d'individus obèses et les taux circulants de fractalkine prédisent le développement du syndrome métabolique (Xueyao et al., 2014). Cependant, les études de souris invalidées pour CX3CR1 ont donné des résultats contradictoires quant à l'implication du couple

CX3CL1/CX3CR1 dans le recrutement des macrophages du tissu adipeux et le développement de l'insulinorésistance (Morris et al., 2012 ; Polyak et al., 2014).

Le groupe des **CXCL** compte 17 membres dont les récepteurs sont les CXCRs. L'implication des couples CXCL5/CXCR2 et CXCL12/CXCR4 ainsi que de CXCL14 dans le recrutement des macrophages du tissu adipeux et le développement de l'insulinorésistance a été montrée par des approches pharmacologiques et/ou l'étude de souris invalidées pour CXCR2 ou CXCR4 ou CXCL14 (Chavey et al., 2009 ; Kim et al., 2014 ; Nara et al., 2007).

Des protéines matricielles pourraient également être impliquées dans le recrutement des macrophages du tissu adipeux. L'ostéopontine est une de ces protéines dont le rôle est le mieux caractérisé (Kahles et al., 2014). Son expression est augmentée dans les macrophages du tissu adipeux de souris soumises à un régime riche en graisses (Nomiyama et al., 2007). L'expression de l'ostéopontine est positivement corrélée avec l'accumulation de macrophages dans le tissu adipeux sous-cutané de patients obèse (Bertola et al., 2009). *In vitro*, l'ostéopontine participe à l'activation des macrophages conduisant à une altération des fonctions des adipocytes (Zeyda et al., 2011). Son invalidation ou sa neutralisation à l'aide d'anticorps réduit l'infiltration des macrophages, l'inflammation du tissu adipeux et l'insulinorésistance de souris soumises à un régime riche en graisses sans modifications de la prise de poids (Chapman et al., 2010; Kiefer et al., 2010 ; Nomiyama et al., 2007).

Récemment, une molécule de guidance neuronale, la Semaphorine-3E exprimée par les adipocytes a été impliqué dans le recrutement des macrophages et l'inflammation du tissu adipeux ainsi que l'insulinorésistance *via* son interaction avec son récepteur la PlexinD1 exprimé par les macrophages (Shimizu et al., 2013). La semaphorine-3E pourrait également jouer un rôle dans l'insulinorésistance chez l'homme car les taux circulants de cette protéine sont élevés chez les diabétiques (Schmidt and Moore, 2013).

En plus de protéines, des composés lipidiques en particulier ceux dérivés de l'acide arachidonique participent au recrutement des macrophages. C'est le cas des leucotriènes qui sont synthétisés par l'enzyme arachidonate-5-lipoxygénase (Alox5). Les taux de leucotriènes sont augmentés dans le tissu adipeux obèse, cette augmentation est due aux adipocytes et est corrélée avec leurs tailles. L'invalidation de l'Alox5 ou de son activateur la protéine FLAP ainsi que l'inhibition pharmacologique de l'Alox5 diminue l'infiltration des macrophages au sein du tissu adipeux et l'insulinorésistance (Horrillo et al., 2010 ; Mothe-Satney et al., 2012). L'invalidation de BLT1, le récepteur des leucotriènes B4 diminue également l'inflammation

et l'insulinorésistance de souris sous régime riche en graisses (Spite et al., 2011). L'inactivation globale ou restreinte au tissu adipeux de la 12/15 lipooxygénase protège également de l'inflammation et l'insulinorésistance (Cole et al., 2012 ; Nunemaker et al., 2008). Les prostaglandines sont augmentées durant l'obésité, de plus les prostaglandines D₂ et E₂ ont un effet chimio-attractif pour les macrophages (Tajima et al., 2008). L'ensemble de ces études indique que la voie de synthèse de dérivés de l'acide arachidonique ou de leurs récepteurs pourrait constituer de nouvelles cibles pharmacologiques.

La majorité des études s'est focalisée sur les molécules pouvant augmenter le recrutement des macrophages dans le tissu adipeux. Cependant, la sortie des macrophages du tissu vers les ganglions lymphatiques pourrait également être perturbée lors de l'obésité contribuant à la persistance de l'inflammation. Récemment, il a été montré que l'expression de la Nétrine-1, une autre molécule de guidance neuronale, et de son récepteur Unc5b étaient augmentées dans le tissu adipeux obèse en particulier dans les macrophages et participaient à la rétention de ceux-ci dans le tissu adipeux obèse. L'inactivation de la Nétrine-1 dans les cellules hématopoïétiques facilite la sortie des macrophages du tissu adipeux, permet de réduire l'inflammation et restaure la sensibilité à l'insuline (Ramkhalawon et al., 2014). Les acides gras saturés augmentent l'expression de la Nétrine-1 (Ramkhalawon et al., 2014) et dans les plaques d'athérome son expression est augmentée par l'hypoxie (Ramkhalawon et al., 2013). Ainsi, les stress nutritionnels ou hypoxiques dans le tissu adipeux pourraient contribuer à la rétention des macrophages *via* l'induction de la Nétrine-1.

Toutes ces études mettent en avant la diversité des facteurs impliqués dans les effets chimio-attractants du tissu adipeux vis-à-vis des macrophages, mais également l'existence de facteurs participant à leur rétention au sein de ce tissu. Tous ces mécanismes participent activement à la mise en place et au maintien d'un état inflammatoire chronique du tissu adipeux associé à une résistance à l'insuline locale mais également systémique.

II.3.3 Les cellules dendritiques du tissu adipeux

Les cellules dendritiques comme les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes. Elles jouent un rôle dans l'immunité innée en favorisant l'accumulation de macrophages dans les sites inflammatoires et dans l'immunité adaptative en présentant des antigènes aux lymphocytes T naïfs permettant ainsi leur différenciation en différentes sous

populations selon l'environnement cytokinique (Dominguez and Ardavin, 2011; Wu and Liu, 2007).

Leur identification dans le tissu adipeux a été compliquée par le fait qu'elles expriment le marqueur CD11c comme la population de macrophages M1 pro-inflammatoire du tissu adipeux. Récemment, il a été montré dans le tissu adipeux de souris obèses une augmentation d'une population de cellules dendritiques (CD11c^{high} B220⁻ F4/80⁻) déjà présentes dans le tissu adipeux de souris minces mais aussi l'apparition d'une population de cellules dendritiques CD11c^{high} B220⁻ F4/80^{low}. Cette population qui exprime également CX3CR1, le récepteur de la fractalkine, est capable d'induire *in vitro* la différenciation de lymphocytes T naïfs en Th17. De même, dans le tissu adipeux sous cutané de patients obèses, le nombre de cellules dendritiques (CD11c⁺CD1c⁺) corrèle positivement avec le BMI, l'insulinorésistance et la différenciation des Th17 (Bertola et al., 2012). Une autre étude a démontré que les cellules dendritiques sont nécessaires pour l'accumulation de macrophages dans le tissu adipeux et le foie. Cette même étude montre que l'absence de cellules dendritiques améliore la sensibilité à l'insuline (Stefanovic-Racic et al., 2012). Cependant, cette conclusion est basée sur le phénotype de souris invalidées pour le ligand de Flt3 et ces souris ont une hématopoïèse altérée affectant non seulement les cellules dendritiques mais aussi les natural killer et les progéniteurs hématopoïétiques. De plus dans cette étude, les souris ne prennent pas de poids lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en graisses (Stefanovic-Racic et al., 2012). Il est donc difficile de dire si les effets observés sur la sensibilité à l'insuline sont liés uniquement à la déplétion des cellules dendritiques.

II.3.4 Les différentes populations de granulocytes du tissu adipeux

La famille des granulocytes inclue les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Si actuellement aucune étude ne semble impliquer des basophiles dans l'inflammation du tissu adipeux, par contre les neutrophiles et les éosinophiles ont été détectés dans le tissu adipeux et impliqués dans la régulation de son inflammation.

Les neutrophiles sont les effecteurs primaires des réactions inflammatoires aiguës entraînant le recrutement des monocytes inflammatoires *via* la production de CCL2 et d'autres chimiokines (Soehnlein et al., 2008). La concentration plasmatique de facteurs dérivés des neutrophiles surtout la myéloperoxydase ainsi que le nombre de neutrophiles activés sont augmentés chez les individus obèses (Andrade et al., ; Nijhuis et al., 2009). Le

nombre de neutrophiles augmente dans le tissu adipeux de souris obèses très précocement après le début du régime alors que celui des macrophages est augmenté plus tardivement (Elgazar-Carmon et al., 2008 ; Talukdar et al., 2012). L'IL-8 produite par les adipocytes pourrait être à l'origine de l'attraction des neutrophiles dans le tissu adipeux (Gerhardt et al., 2001). En suivant l'expression de la myéloperoxydase, il a été initialement montré que cette infiltration dans le tissu adipeux de souris était transitoire contrairement à celle des macrophages, avec une diminution du nombre des neutrophiles une semaine après le début du régime riche en graisses (Elgazar-Carmon et al., 2008). Par contre une étude plus récente utilisant la cytométrie en flux a conclu que les neutrophiles, définis comme des cellules CD11b⁺Ly-6g⁺CD11c⁻F4/80⁻, s'accumulaient dans le tissu adipeux pendant une longue période (Talukdar et al., 2012). Les neutrophiles contribuent à l'inflammation du tissu adipeux et à l'insulinorésistance par leur capacité à sécréter une élastase (Neutrophile élastase) comme le démontre l'amélioration de l'inflammation du tissu adipeux et de la sensibilité à l'insuline de souris traitées avec un inhibiteur de cette élastase ou invalidées pour celle-ci (Talukdar et al., 2012). Les mécanismes évoqués pour expliquer ces résultats sont la dégradation de IRS-1 et l'activation de la voie du TLR4 par l'élastase des neutrophiles qui pourrait induire la polarisation M1 pro-inflammatoire des macrophages (Talukdar et al., 2012).

Les éosinophiles sont les premiers effecteurs de défense contre les infections par des parasites et dans les réactions allergiques. Les éosinophiles secrètent des facteurs participant à la réponse anti-inflammatoire, orientant les macrophages vers le profil M2 et différenciant les cellules T en Th2 (Spencer and Weller, 2010). Les éosinophiles sont la source principale des cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-13 dans le tissu adipeux et leur nombre diminue avec l'obésité. L'analyse de souris génétiquement modifiées dépourvues d'éosinophiles ainsi que de souris dans lesquelles le nombre d'éosinophiles a été augmenté ont démontré leur importance pour le maintien de la polarisation M2 des macrophages du tissu adipeux *via* la production d'IL-4 et d'IL-13 ainsi que pour l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et le contrôle de l'homéostasie glycémique (Wu et al., 2011).

La production d'éosinophile dans la moelle osseuse et leur recrutement dans le tissu adipeux est sous le contrôle de l'IL-5. La source principale d'IL-5 dans le tissu adipeux sont les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2s), une population de cellules immunitaires récemment identifiée. L'accumulation des éosinophiles dans le tissu adipeux et le maintien de la

polarisation M2 des macrophages est dépendante de cette population de cellules immunitaires et la perte de cette population aggrave l'obésité et l'insulinorésistance chez la souris (Molofsky et al., 2013).

Les éosinophiles s'avèrent donc être des cibles thérapeutiques intéressantes de par leur capacité à diminuer la réponse inflammatoire permettant ainsi une amélioration de l'inflammation du tissu adipeux et de la sensibilité à l'insuline.

II.3.5 Les mastocytes du tissu adipeux

L'activation des mastocytes est impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires telles que l'asthme, les allergies ou l'anaphylaxie, il est également suggéré leur rôle dans les réactions de défense face des infections de parasites et bactériennes. Quand les mastocytes sont activés, ils sécrètent différents médiateurs pro et anti-inflammatoires. Deux types de mastocytes existent : ceux sécrétant uniquement la tryptase et ceux exprimant à la fois la tryptase et la chymase. Le nombre de ces derniers est augmenté dans le tissu adipeux de patients obèses et dans des modèles murins d'obésité (Altintas et al., 2011 ; Altintas et al., 2012 ; Xu and Shi, 2012). Les souris avec une mutation dans le promoteur du gène c-kit (souris ^{KitW-sh}/Kit^{W-sh}) sont dépourvues de mastocytes et mises sous un régime riche en graisses prennent moins de poids et sont protégées de l'insulinorésistance. De même, des souris traitées avec un stabilisateur des mastocytes (disodium cromoglycate) démontrent une faible infiltration des macrophages dans le tissu adipeux, une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une réduction de la prise de poids induites par un régime riche en graisses. La production d'IL-6 et d'interféron- γ par les mastocytes joue un rôle important dans ce phénotype (Liu et al., 2009). En plus de ces deux cytokines, les mastocytes sécrètent de nombreux autres facteurs pouvant affecter la biologie du tissu adipeux. En particulier les mastocytes pourraient favoriser l'adipogenèse par leur capacité à sécréter la 15-deoxy-delta12,14-prostaglandine-J2, un activateur de PPAR γ , facteur de transcription jouant un rôle majeur dans la différenciation des préadipocytes (Ishijima et al., 2013 ; Tanaka et al., 2011). Les mastocytes pourraient également favoriser l'angiogenèse au sein du tissu adipeux car il a été montré que la chymase peut contrôler l'angiogenèse. En accord avec cette hypothèse, interférer avec la fonction des mastocytes dans le tissu adipeux diminue l'angiogenèse (Liu et al., 2009).

L'effet bénéfique de la réduction du nombre ou de la fonction des mastocytes du tissu adipeux sur la sensibilité à l'insuline semble donc principalement la conséquence d'une modification de la prise de poids et du développement du tissu adipeux plutôt qu'un effet direct sur son l'inflammation.

II.3.6 Les cellules lymphoïdes du tissu adipeux

Les lymphocytes B et T jouent un rôle majeur dans l'immunité adaptative et différentes études ont montré que des lymphocytes B et T infiltraient le tissu adipeux et que leur nombre est corrélé positivement avec l'adiposité chez l'homme et dans les modèle d'obésité chez la souris (Mathis, 2013 ; Wu et al., 2007). Un rôle de ces lymphocytes dans le contrôle du métabolisme et l'inflammation du tissu adipeux a été récemment mis en évidence pour plusieurs familles de ces lymphocytes.

L'obésité augmente le nombre de lymphocytes T cytotoxique CD8 dans le tissu adipeux obèse et parallèlement la production d'interféron- γ et de granzyme B qui sont produits par ces cellules (Nishimura et al., 2009 ; Winer et al., 2009). Les lymphocytes T CD8 infiltrants le tissu adipeux ont un répertoire TCR restreint comparé à ceux de la rate suggérant qu'ils sont spécifiques pour un ou des antigènes non encore identifiés (Yang et al., 2010). L'augmentation des lymphocytes T CD8 précède celle des macrophages pro-inflammatoires et la déplétion en lymphocytes T CD8 chez la souris obèse améliore l'insulinorésistance et l'inflammation du tissu adipeux concomitamment à une baisse des macrophages pro-inflammatoires CD11c⁺ (Nishimura et al., 2009). Dans le tissu adipeux d'obèses pourrait également se mettre en place une expansion clonale des lymphocytes T CD8 contrôlée par des facteurs sécrétés par les adipocytes comme le suggèrent des expériences de co-culture entre lymphocytes T CD8 et tissu adipeux (Nishimura et al., 2009). Les lymphocytes T CD8 pourraient donc jouer un rôle crucial dans l'initiation et la propagation de l'inflammation du tissu adipeux.

L'autre grande sous population de lymphocytes T est constituée par les lymphocytes T CD4 qui se subdivisent en lymphocyte T helper (Th1, Th2 et Th17) et régulateurs (Treg caractérisés par le marqueur Foxp3). Le nombre global des CD4⁺ augmente dans le tissu adipeux lors de l'obésité mais les différentes populations sont affectées de manière différente. Ainsi, plusieurs groupes ont rapporté un enrichissement en lymphocytes Th1

producteur d'interferon- γ dans le tissu adipeux de souris obèses par rapport au minces (Feuerer et al., 2009 ; Zuniga et al., 2010). Ces cellules pourraient reconnaître des antigènes putatifs présentés par les cellules dendritiques ou les macrophages (Morris et al., 2013) ou même les adipocytes puisque ces derniers expriment des molécules du complexe II d'histocompatibilité (Deng et al., 2013 ; Meijer et al., 2011). L'interaction entre les molécules CD40L (D40 ligand) présentes sur les lymphocytes et le CD40 exprimé par les adipocytes pourrait également contribuer au dialogue entre ces deux populations de cellules et à l'insulinorésistance des adipocytes (Poggi et al., 2009). Les lymphocytes CD4 Th1 en association avec les CD8 pourraient donc contribuer à l'inflammation du tissu adipeux et à l'insulinorésistance associée à l'obésité. A l'inverse des Th1, les CD4 Th2 pourraient avoir un rôle protecteur et leur nombre semble diminuer dans le tissu adipeux lors de l'obésité (Winer et al., 2009). Les Tregs sont l'autre population de lymphocytes T CD4 jouant un rôle protecteur contre l'inflammation du tissu adipeux. Les Tregs sont très abondants dans le tissu adipeux de souris minces représentant environ 40 % de la population de CD4, ce qui est nettement supérieur à la fréquence habituellement observée dans d'autres tissus (Feuerer et al., 2009). La proportion de Tregs dans le tissu adipeux diminue avec l'âge chez la souris en parallèle de la diminution de la sensibilité à l'insuline. De même, une corrélation inverse entre proportion de Tregs du tissu adipeux, son inflammation et l'insulino-sensibilité a été montrée dans différents modèles d'obésité (Cipolletta, 2014). L'étude de modèles de souris avec une augmentation ou une diminution des Tregs du tissu adipeux a clairement démontré l'importance de la baisse des Tregs dans l'inflammation du tissu adipeux et le développement de l'insulinorésistance lors de l'obésité (Cipolletta, 2014). Les Tregs du tissu adipeux ont une signature génique différente de celle des Tregs d'autres tissus. En particulier ils expriment de nombreux gènes impliqués dans le contrôle du métabolisme lipidique et ils expriment également le facteur de transcription adipogénique PPAR γ . Une partie des effets bénéfiques des molécules antidiabétiques de la famille des TZD qui activent PPAR γ pourrait passer par une modulation des Tregs du tissu adipeux. En effet, les TZD augmentent les Tregs dans le tissu adipeux mais pas dans les autres tissus et l'absence de Tregs dans le tissu adipeux oblitère les effets bénéfiques des TZD sur la sensibilité à l'insuline (Cipolletta, 2014 ; Cipolletta et al., 2012). Une autre caractéristique des Tregs du tissu adipeux est que leur répertoire TCR est restreint par rapport au Treg des organes lymphoïdes suggérant qu'un ou des antigènes sont responsables de leur présence dans le tissu adipeux. Pour l'instant, ces

antigènes n'ont pas été identifiés. Leur identification permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'accumulation et de rétention des Tregs dans le tissu adipeux et pourrait éventuellement permettre de prévenir la baisse des Tregs dans ce tissu lors de l'obésité.

Les autres populations de lymphocytes T identifiées dans le tissu adipeux sont constituées par les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les NKTs (Natural Killer T). Les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont été identifiés comme la source principale d'IL-17 dans le tissu adipeux (Caspar-Bauguil et al., 2005 ; Zuniga et al., 2010). Des lymphocytes Th17 pourraient également participer à la production d'IL-17 dans le tissu adipeux. L'IL-17 régule la production d'autres cytokines comme l'IL-6 et inhibe la différenciation adipocytaire en partie en induisant l'expression de COX2 et la production de PGE2 (Ahmed and Gaffen, 2010).

Les NKTs constituent une population de cellules T qui reconnaît des antigènes lipidiques présentés principalement par la molécule CD1d exprimée par de nombreux types cellulaires dont les cellules dendritiques, les macrophages et les adipocytes (Huh et al., 2013 ; Spada et al., 2000). Les NKTs sont subdivisés en deux sous-populations les iNKT (invariant NKT) et les vNKT (variant NKT) produisant des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α ou l'interféron- γ ainsi que des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4 ou l'IL-13. Chez des individus minces, les iNKTs sont enrichis dans le tissu adipeux et leur nombre diminue avec l'obésité (Lynch et al., 2012; Lynch et al., 2009). Cependant leur rôle dans l'inflammation du tissu adipeux et l'insulinorésistance n'est pas clair car les différentes études utilisant des modèles de souris dépourvues de NKT ont donné des résultats contradictoires. Les différences observées pourraient être liées à la durée du régime riche en graisses. En effet, les iNKT semblent avoir un effet protecteur pour des durées de régime inférieures à 8 semaines par contre pour des durées supérieures, ils peuvent avoir, selon les études, des effets protecteurs ou pathogéniques (Rakhshandehroo et al., 2013). La diminution du nombre des iNKTs lors de l'obésité laisse tout de même supposer leur rôle potentiel dans la maintenance du profil anti-inflammatoire du tissu adipeux chez des individus minces.

Les Natural Killer (NK) sont une autre population de cellules lymphoïdes mais qui contrairement aux lymphocytes T et B n'expriment pas de récepteurs aux antigènes et sont donc considérés comme des cellules de l'immunité innée. L'implication des NK dans l'inflammation du tissu adipeux est encore peu étudiée et les quelques études dans le domaine ne permettent pas pour l'instant d'avoir une vision claire de leur rôle (Chmelar et al., 2013) même si une étude récente montre que l'ablation des NKs chez la souris diminue

l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux lors de l'obésité associée à une amélioration modeste de la sensibilité à l'insuline et de l'inflammation de ce tissu (O'Rourke et al., 2014).

Les lymphocytes B représentent l'autre grande classe de cellules de l'immunité adaptative. Ils interviennent dans l'immunité notamment en produisant des anticorps spécifiquement dirigés contre des antigènes étrangers mais ils peuvent également présenter des antigènes. L'obésité augmente le nombre des cellules B dans le tissu adipeux, et la déplétion des cellules B améliore la sensibilité à l'insuline. De plus, les taux d'anticorps IgG2c provenant des cellules B sont élevés chez les animaux obèses et leur transfert dans des animaux minces aboutit à une inflammation du tissu adipeux et au développement d'une insulino-résistance (Winer et al., 2011). Le recrutement des cellules B dans le tissu adipeux précède la polarisation des macrophages en type M1, et il est suggéré que cette polarisation serait induite par les IgG2c (Duffaut et al., 2009). Cette hypothèse est soutenue par le fait que la déplétion des cellules B permet de réduire les macrophages M1 dans le tissu adipeux (Winer et al., 2011). Ces études suggèrent donc une participation importante des cellules B par leur production d'anticorps dans l'inflammation du tissu adipeux et ses complications.

Ainsi, le tissu adipeux est peuplé par différentes populations de cellules immunitaires impliquées aussi bien dans l'immunité innée qu'adaptative. Les proportions de ces populations cellulaires sont modifiées lors de l'obésité aboutissant schématiquement à une augmentation des populations pro-inflammatoires alors que les populations anti-inflammatoires prédominent dans le tissu adipeux mince. Les cellules immunitaires interagissent avec les cellules métaboliques que sont les adipocytes et influent sur leur métabolisme. Les adipocytes influent également sur la fonction de ces cellules immunitaires indiquant qu'immunité et métabolisme sont intrinsèquement reliés et ouvrant un nouveau champ d'investigation dans le domaine des maladies métaboliques : l'immuno-métabolisme. Les différents facteurs pro-inflammatoires sécrétés dans le tissu adipeux lors de l'obésité participent et aggravent les dysfonctions du tissu adipeux contribuant ainsi à l'insulino-résistance. Au niveau moléculaire, ces différents facteurs agissent en activant différentes voies de signalisation inflammatoire.

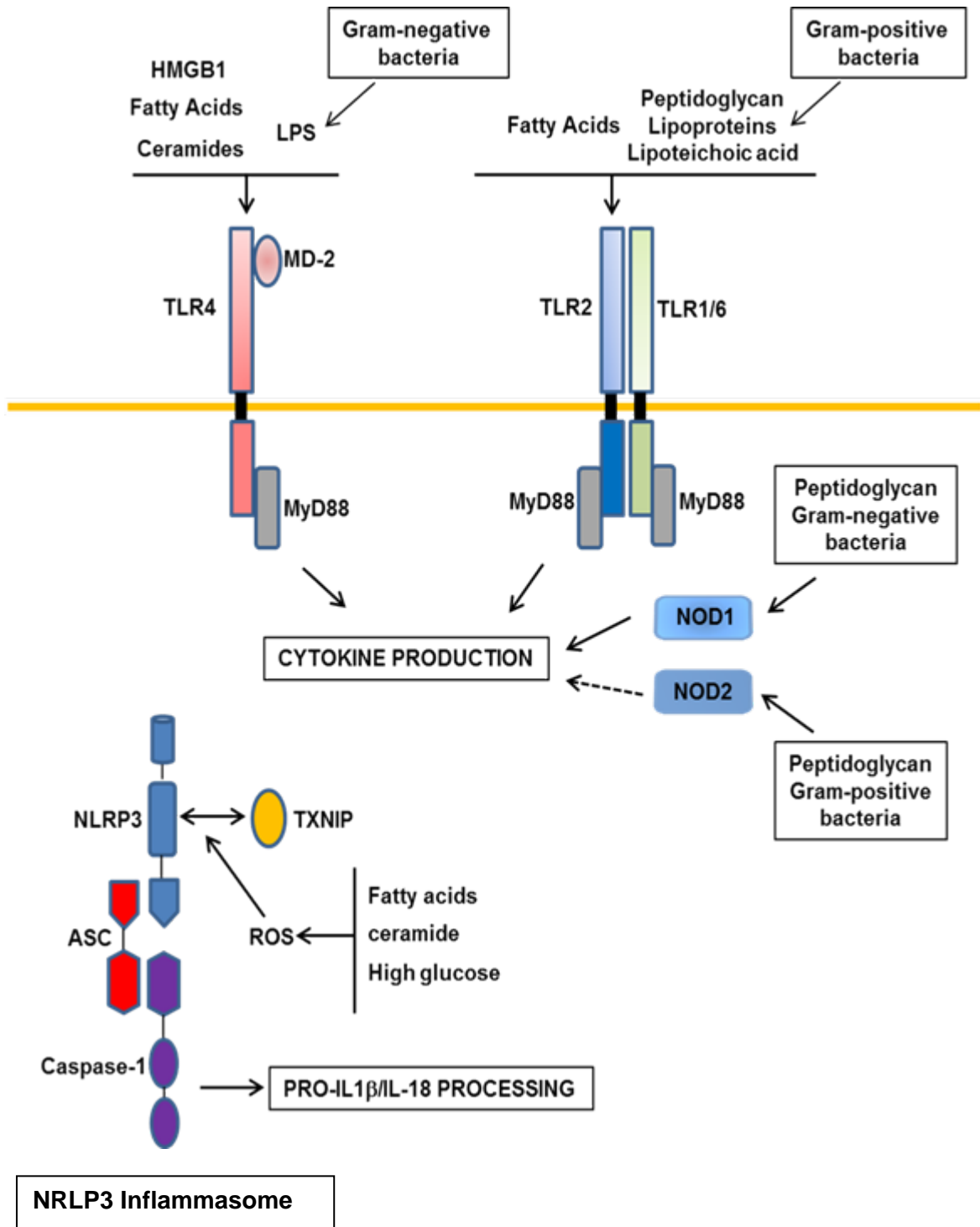


Figure 16 : Activation des senseurs de stress et production de cytokines

Les récepteurs TLR (Toll-Like Receptors) sont capables de reconnaître les acides gras, les céramides et des facteurs bactériens reconnus également par les NOD (Nucléotide Oligomerization Domain). Les TLR et le NOD vont alors activer des voies de signalisations impliquées dans la production de cytokines inflammatoires. Certaines cytokines telles que l'IL-1b et l'IL-18 doivent être maturées par l'inflammasome avant d'être secrétées.

Chapitre III : Voies de signalisation inflammatoires impliquées dans l'insulinorésistance

III.1 Toll Like Recepteur (TLR) et insulinorésistance

Chez l'homme et la souris on dénombre actuellement 13 membres dans la famille des Toll-Like Récepteurs (TLR). Les TLR jouent un rôle crucial dans l'immunité innée du fait de leur capacité de reconnaissance des pathogènes par leur domaine PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) ainsi que des lésions tissulaires par leur domaine DAMPs (Danger-associated molecular patterns) (Mogensen, 2009) (**Figure 16**).

Ces récepteurs se présentent sous la forme de dimères, la plupart des TLR sont des homodimères, cependant le TLR2 a la particularité de pouvoir s'associer avec le TLR1 ou le TLR6 avec une spécificité de ligand différente pour chaque hétérodimère formé. Lorsqu'un TLR est activé, il recrute une protéine adaptatrice qui va par la suite interagir avec d'autres protéines pour propager le signal. A ce jour, quatre protéines adaptatrices sont dans la signalisation des récepteurs TLR : MyD88, TIRAP (aussi appelé MAL), TRIF et TRAM. Les TLR peuvent aussi dépendre d'autres co-récepteurs pour la sensibilité totale au ligand, par exemple pour reconnaître le LPS le TLR4 requiert MD-2.

Parmi les différents membres des TLR, de nombreux groupes ont montré le rôle de TLR2 et de TLR4 dans l'inflammation et l'insulinorésistance durant l'obésité (Fresno et al., 2011). Le TLR4 est retrouvé augmenté chez les souris obèses et les patients obèses et diabétiques et est négativement corrélé avec la sensibilité à l'insuline (Konner and Bruning, 2011). Il a récemment été proposé que durant l'obésité, on observe une modification de la composition de la flore intestinale qui est associée à une perméabilisation de l'épithélium intestinal. Cette modification aboutit à une élévation modérée de la concentration dans la circulation sanguine des lipopolysaccharides (LPS) (Burcelin et al., 2011 ; Cani and Delzenne, 2009). Le LPS est capable de se fixer sur le TLR4 et cette interaction participerait au développement de l'inflammation et des désordres métaboliques observés durant l'obésité. L'expression du TLR4 par les macrophages, les cellules dendritiques, les adipocytes, les hépatocytes, les muscles et l'hypothalamus permet d'expliquer son implication dans ces désordres métaboliques. Dans les adipocytes et les macrophages le TLR4 est également

décrit pour être capable de lier les acides gras saturés, ce qui contribuerait au dialogue entre ces deux types cellulaires et à la production de cytokines inflammatoires (Suganami et al., 2007b).

L'étude *in vivo* de l'implication du TLR4 dans l'inflammation induit par l'obésité et dans la résistance à l'insuline a été rendue possible grâce à l'utilisation de souris invalidées pour TLR4 (TLR4^{-/-}) ou des souris possédant une mutation perte de fonction dans le gène *Tlr4* (C3H/HeJ et C57BL/10ScN). Les différentes études mettent en évidence une légère réduction de l'inflammation dans le tissu adipeux et le foie (Poggi et al., 2007 ; Shi et al., 2006b ; Tsukumo et al., 2007). Cette diminution de l'inflammation du tissu adipeux est corrélée à une diminution de l'infiltration des macrophages ou à un changement de leur polarisation vers un profil M2 anti-inflammatoire (Orr et al., 2012). Le foie est partiellement protégé avec une diminution de la stéatose et le développement d'une stéatohépatite non-alcoolique.

Cependant des résultats contradictoires ont été retrouvés au niveau de la prise de poids, avec des études indiquant une diminution de l'obésité induite par un régime hyperlipidique tandis que d'autres ne retrouvent pas de différences par rapport aux souris sauvages (Poggi et al., 2007 ; Shi et al., 2006b ; Tsukumo et al., 2007). La majorité de ces études met en évidence une amélioration de la sensibilité à l'insuline, dans les souris invalidées pour TLR4, que ce soit au niveau systémique mais également dans le tissu adipeux et le foie. D'autres groupes ont étudié les conséquences de l'invalidation du TLR4 spécifiquement dans les cellules immunitaires en transplantant des souris sauvages avec de la moelle osseuse de souris déficientes pour le TLR4. Une étude montre que ces souris développent une obésité équivalente aux souris sauvages, mais moins d'inflammation et d'insulinorésistance dans le tissu adipeux et le foie (Saber et al., 2009). A l'inverse, deux autres études utilisant la même stratégie, mais dans des fonds génétiques différents, ne retrouvent pas d'amélioration de l'insulinorésistance malgré une diminution de l'inflammation du tissu adipeux (Coenen et al., 2009 ; Orr et al., 2012). Il ressort de ces études que l'invalidation de TLR4 dans les cellules immunitaires permet de diminuer l'infiltration et/ou l'activation de ces cellules dans les tissus.

Toutes ces études mettent en évidence que la prise de poids et l'insulinorésistance dépendent du fond génétique, du sexe des souris ainsi que de la durée et la composition des régimes. La quantité de lipides contenus dans les régimes pourrait être importante comme l'indique une étude qui retrouve une amélioration de l'insulinorésistance en utilisant un

régime très riche en lipides (Davis et al., 2008). Il reste à déterminer si le TLR4 est activé directement par les acides gras ou indirectement par des sécrétions cellulaires ou encore par l'augmentation du LPS induit par la modification de la flore intestinale. Les effets contradictoires observés entre toutes ces études peuvent également être expliqués par une possible compensation par le TLR2. En effet, le TLR2 est également capable de détecter les lipoprotéines et les acides gras saturés en se démeritant avec le TLR1 et le TLR6 (Mogensen, 2009). Le rôle de TLR2 dans les complications métaboliques associées à l'obésité est suggéré du fait de l'augmentation de son expression dans les différents tissus métaboliques de souris et de patients obèses (Fresno et al., 2011). Les analogies de fonction pourraient expliquer les phénotypes similaires des souris déficientes pour le TLR4 et le TLR2. En effet, les souris déficientes pour le TLR2 présentent une amélioration de l'insulinorésistance et de l'inflammation du tissu adipeux, du foie et des muscles, associées à une diminution de la prise de poids (Ehse et al., 2010 ; Himes and Smith, 2010 ; Kuo et al., 2011).

La perte de fonction des TLR dans les cellules immunitaires peut également altérer la flore intestinale aboutissant au développement de l'inflammation, l'obésité et de la résistance à l'insuline, comme l'indique l'étude de souris déficientes pour le TLR5 (Vijay-Kumar et al., 2010).

Toutes ces études démontrent les rôles importants que jouent les récepteurs TLR dans l'inflammation des tissus associée à l'obésité. En réponse au LPS ou aux acides gras, qui sont retrouvés en excès dans la circulation d'individus obèses. Ces récepteurs vont ainsi activer des voies de signalisation impliquées dans la production de cytokines inflammatoires. Leur activation participent donc activement à la mise en place de l'inflammation, et donc de l'insulinorésistance qui y est associée.

III.2 NOD, inflammasome et insulinorésistance

Les NOD (Nucleotide Oligomerization Domain) 1 et 2 sont des protéines intracellulaires capables de reconnaître les fractions de peptidoglycanes issues des parois de bactéries (Mogensen, 2009) (**Figure 16**). Les protéines NOD ont récemment été décrites comme des senseurs immunitaires impliqués dans l'insulinorésistance associée à l'inflammation. L'activation de NOD1 dans les adipocytes et les hépatocytes et de NOD2 dans les cellules

musculaires participe à la résistance à l'insuline au travers de la production de médiateurs inflammatoires et l'activation des MAP kinases (Schertzer et al., 2011 ; Tamrakar et al., 2010). L'injection d'un ligand de NOD1 dans les souris induit une inflammation du tissu adipeux et une insulino-résistance systémique avec une forte diminution de l'action de l'insuline au niveau du foie. Tandis que l'injection d'un ligand de NOD2 induit une légère insulino-résistance et préférentiellement dans le muscle (Schertzer et al., 2011). Ce qui est en accord avec une protection des souris déficientes pour NOD1 contre l'intolérance au glucose et contre le diabète induit par un régime riche en graisses, tandis que les souris déficientes pour NOD2 ne sont pas protégées (Amar et al., 2011a).

L'inflammasome est un complexe de trois protéines : la protéine NLR (Nucleotide-binding domain Leucine-rich Repeat), la protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD) et la caspase 1. Il existe quatre inflammasomes nommés NLRP1, NLRP3, NLRC4 et AIM2 (**Figure 16**). Les pathogènes et les signaux associés aux dangers activent l'inflammasome aboutissant à la maturation de l'IL-1 β et l'IL-18 par la caspase 1 (Mogensen, 2009). L'IL-1 β est connue pour être une cytokine fortement impliquée dans l'altération de la voie de signalisation de l'insuline (Jager et al., 2007). Au travers des effets délétères de cette cytokine de nombreux groupes ont étudié l'implication de l'activation de l'inflammasome dans la résistance à l'insuline. On observe en effet une augmentation de NLRP3 et de la caspase 1 dans le tissu adipeux de souris et d'individus obèses avec ou sans diabète (Stienstra et al., 2010 ; Vandanmagsar et al., 2011). L'augmentation de NLRP3 est retrouvée dans les macrophages mais également dans les adipocytes, néanmoins la contribution de chaque type cellulaire est controversée. L'inactivation des différents composants de l'inflammasome NLRP3 (NLRP3, ASC et caspase 1) protège les souris de l'inflammation et de l'insulino-résistance induites par un régime riche en graisses. Ces phénotypes sont associés à une diminution de l'expression de l'IL-1 β dans le tissu adipeux et à une diminution des niveaux circulants de l'IL-18 (Stienstra et al., 2010 ; Vandanmagsar et al., 2011 ; Wen et al., 2011). Outre son rôle dans l'inflammation du tissu adipeux, l'activation de l'inflammasome dans les adipocytes pourrait limiter les dépenses énergétiques, l'oxydation des acides gras et l'adipogenèse comme le démontre les souris invalidées pour la caspase 1 (Stienstra et al., 2010 ; Stienstra et al., 2011). L'activation de l'inflammasome par les acides gras et les céramides suggère que l'environnement lipotoxique lié à l'obésité

participe à son activation. Le rôle des autres inflammasomes dans l'inflammation et la résistance à l'insuline n'est pas encore connu, et mériterait d'être analysé sachant que la déplétion de NLRP3 n'est pas associée à une totale inactivation de la caspase 1 (Vandanmagsar et al., 2011).

Tous ces résultats convergent pour définir l'inflammasome NLRP3 comme une cible pharmacologique intéressante dans le traitement des complications associées à l'obésité. Ce qui est conforté par l'inhibition pharmacologique de la caspase 1 dans des souris *ob/ob* qui permet de réduire la prise de poids et d'améliorer la sensibilité à l'insuline (Stienstra et al., 2010). Etant donné le rôle des inflammasomes dans l'immunité, l'utilisation d'inhibiteurs pourrait diminuer la capacité des individus à se défendre contre une infection.

Il est maintenant reconnu que les senseurs immunitaires tels que les TLR, les NOD et les inflammasomes participent au développement d'une inflammation métabolique. Il est suggéré que les niveaux élevés de nutriments absorbés lors de l'obésité pourraient être suffisant pour participer à la stimulation des senseurs de pathogènes et de dangers aboutissant à l'activation des cellules immunitaires dans les tissus métaboliques. Les conséquences sont alors une surproduction de cytokines inflammatoires qui vont activer des voies de signalisation dans les cellules métaboliques et ainsi diminuer les réponses biologiques de l'insuline (**Figure 17**).

III.3 Rôle de la voie IKK/NF- κ B dans la physiopathologie de l'insulinorésistance

III.3.1 Structure et mécanismes d'action du complexe IKK (Inhibitor κ B Kinase)

Le complexe IKK est impliqué dans l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B), qui régule l'expression d'un grand nombre de gènes essentiels dans le développement immunitaire, dans l'immunité innée et adaptative, dans la réponse inflammatoire, dans la survie et dans la prolifération cellulaire.

Le complexe IKK est formé de deux sérine/thréonine kinases, IKK α (ou IKK1) et IKK β (ou IKK2), et d'une sous-unité régulatrice IKK γ (ou NEMO). Seules les sous-unités α et β possèdent une activité catalytique, et peuvent s'associer avec IKK γ en homodimère ou en

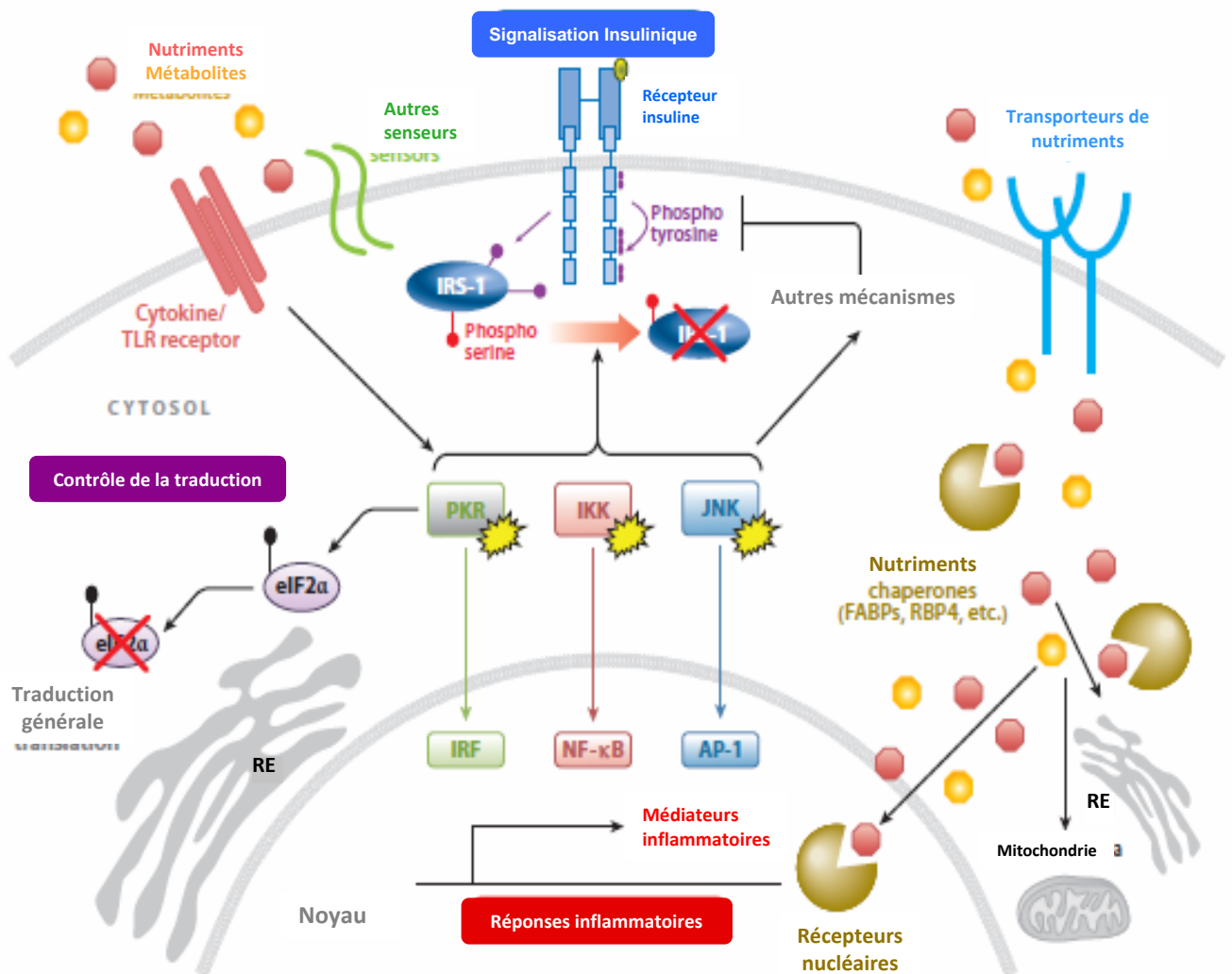


Figure 17 : Induction des différentes voies de signalisation inflammatoires et altération des fonctions biologiques de l'insuline

Les nutriments et autres métabolites sont capables d'interagir avec les récepteurs des cytokines et les Toll-like récepteurs (TLR) aboutissant à l'activation de kinases importantes dans la transduction de signaux de stress et dans l'altération de la voie de signalisation de l'insuline.

hétérodimère. Il semble cependant que les hétérodimères aient une efficacité catalytique supérieure à celle des homodimères.

Deux grandes voies de signalisation dans l'activation de NF- κ B ont été décrites, la voie dite canonique ou classique, dépendante d'IKK β et d'IKK γ , et la voie non canonique ou alternative, dépendante uniquement d'IKK α (Pomerantz and Baltimore, 2002). La plupart des stimuli capables d'activer la voie classique ne peuvent pas activer la voie alternative, tandis que les activateurs de la voie alternative peuvent activer les deux voies (Solt and May, 2008).

La voie classique peut être activée par stimulation des différents récepteurs membranaires tels que les TLR, les récepteurs du TNF (TNFR), et les récepteurs de l'IL-1 (IL-1R) en réponse à des stimuli tels que le LPS, les acides gras et les cytokines pro-inflammatoires (Brasier et al., 2006).

L'activation des IKK, par phosphorylations des sous-unités α et β , va phosphoryler la protéine inhibitrice de NF- κ B, appelée I κ B- α , ce qui va induire sa dégradation par le protéasome et permettre la libération des dimères de NF- κ B. Ces dimères libres vont pouvoir transloquer dans le noyau et réguler la transcription de gènes cibles. L'activation de cette voie permet la transcription de gènes codants pour des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF), des chimiokines (CXCL8, CCL2 et CCL3), des molécules d'adhésion des leucocytes (Sélectine-E, ICAM-1 et VCAM-1) et différents gènes de survie et anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-X_L et XIAP) (Solt and May, 2008).

La voie alternative est activée par la stimulation de certains membres de la famille des récepteurs au TNF (TNFR) tels que LT β R (lymphotoxin- β receptor), CD40, RANK et BAFF-R (B cell-activating factor receptor).

L'activation de la voie alternative nécessite l'activation de la kinase NIK/MAP4K4 qui au travers du recrutement d'IKK α va induire la translocation du dimère NF- κ B p52/RelB dans le noyau. Cette voie alternative va permettre la transcription des gènes tels que BAFF (ligand des BAFF-R) et les chimiokines CXCL12, CXCL13, CCL19 et CCL21.

Les principales fonctions de l'activation de NF- κ B par la voie alternative sont le développement des organes lymphoïdes, la survie et la maturation des cellules B (Beinke and Ley, 2004 ; Pomerantz and Baltimore, 2002 ; Solt and May, 2008).

L'activation de la voie IKK/NF- κ B par divers stimuli (LPS, cytokines et acides gras) entraîne la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, le tissu adipeux et le foie qui vont participer et amplifier l'altération de la signalisation insulinique.

III.3.2 Implication de la voie IKK/NF- κ B dans l'altération de la signalisation insulinique et dans le métabolisme adipocytaire

La kinase IKK β est capable de phosphoryler IRS-1 sur de nombreux résidus sérine en réponse à différents agents diabétogènes, tels que les cytokines inflammatoires, les sphingomyelinases, les céramides et les acides gras non estérifiés. Les sites directement phosphorylés par IKK β se trouvent majoritairement localisés proche du domaine PTB d'IRS-1, induisant une diminution de son interaction avec le récepteur de l'insuline mais également avec la sous-unité p85 de la PI3-K. Des approches génétiques et pharmacologiques ont permis de confirmer l'implication d'IKK β dans la phosphorylation des sites Ser³⁰⁷, Ser³¹² et Ser⁴⁰⁸ d'IRS-1 (Austin et al., 2008 ; Gao et al., 2003).

La kinase IKK β peut avoir des effets indirects sur IRS-1 en interagissant avec la protéine TSC1 permettant l'activation de mTOR et donc de la S6K1. Les kinases mTOR et S6K1 sont capables de phosphoryler IRS-1 sur des résidus sérine et donc d'altérer la signalisation de l'insuline.

Un autre mécanisme relie IKK β à la diminution de la phosphorylation d'IRS-1 sur des résidus tyrosine au travers de l'augmentation de l'expression de la tyrosine phosphatase PTP1B. Ce mécanisme a été décrit dans le tissu adipeux, le foie, les muscles squelettiques et le noyau arqué de l'hypothalamus en réponse aux cytokines inflammatoires (Zabolotny et al., 2008).

Dans les adipocytes, le TNF α réprime de nombreux gènes impliqués dans le transport de glucose et dans le stockage des acides gras et du glucose. Le TNF α module également l'expression de certaines adipokines, on observe ainsi une diminution de l'expression de l'adiponectine, décrite pour avoir des effets anti-inflammatoires. Ces changements géniques des adipocytes vont profondément altérer leurs fonctions métaboliques et sécrétoires participant au développement de la résistance à l'insuline. La stimulation des adipocytes par le TNF α induit l'activation du facteur NF- κ B, responsable des effets délétères de cette cytokine (Ruan and Lodish, 2004). La voie de signalisation IKK/NF- κ B est également impliquée dans la lipolyse induite par le TNF α , notamment *via* l'augmentation de

l'expression de la lipase hormono-sensible (HSL) et la diminution de la périlipine qui permet de réguler l'accessibilité des gouttelettes lipidiques par la HSL (Laurencikienė et al., 2007).

III.3.3 Apports des animaux génétiquement modifiés pour la voie IKK/NF- κ B

Les souris invalidées pour la kinase IKK β sont non viables au stade embryonnaire, elles meurent en raison d'une importante apoptose des cellules hépatiques (Li et al., 1999).

Les souris hétérozygotes pour IKK β sont viables et présentent un phénotype normal. Les souris IKK $\beta^{+/-}$ rendues obèses par un régime hyperlipidique, ou génétiquement par délétion du gène de la leptine, présentent une amélioration de la glycémie et l'insulinémie à jeun, une meilleure tolérance au glucose et une meilleure sensibilité à l'insuline (Yuan et al., 2001). Les souris génétiquement invalidées pour la sous-unité p50 de NF- κ B sont résistantes à la prise de poids et à la résistance à l'insuline induites par un régime riche en graisses, elles présentent notamment une meilleure sensibilité à l'insuline au niveau hépatique (Gao et al., 2009).

Ces études *in vivo* mettent en évidence l'implication de la voie IKK/NF- κ B dans l'insulinorésistance. A partir de ces observations, de nombreux modèles de souris invalidées pour IKK β de manière tissu spécifique ont été développés afin d'étudier plus sélectivement l'implication de cette kinase au niveau de chaque organe.

L'invalidation d'IKK β dans le muscle ne semble pas impliquer cette kinase dans le développement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité (Rohl et al., 2004). L'invalidation d'IKK β ou d'IKK γ spécifiquement dans le foie améliore la tolérance au glucose et la sensibilité hépatique à l'insuline des souris obèses, mais ne les protège que partiellement de la résistance à l'insuline systémique (Wunderlich et al., 2008). Par contre, l'invalidation d'IKK β dans les cellules myéloïdes prévient le développement de la résistance à l'insuline des souris mises sous régime hyperlipidique, suggérant un rôle important d'IKK β dans la production des cytokines inflammatoires (Arkan et al., 2005). Enfin, l'invalidation d'IKK β dans l'hypothalamus prévient le développement de l'obésité et de l'insulinorésistance en diminuant la prise alimentaire, les effets opposés sont observés lorsqu'on exprime une forme constitutivement active d'IKK β (Zhang et al., 2008).

III.3.4 Apports des inhibiteurs pharmacologiques

L'aspirine et les salicylates sont des inhibiteurs des cyclo-oxygénases, et fonctionnent également comme des inhibiteurs d'IKK β . Ces molécules sont utilisées depuis de nombreuses années dans le traitement de maladies inflammatoires telles que le rhumatisme articulaire aigu et la polyarthrite rhumatoïde.

Le traitement de souris obèses avec du salicylate améliore la glycémie à jeun, la tolérance au glucose, l'insulinémie et la sensibilité à l'insuline de ces animaux (Kim et al., 2001). Ces résultats sont appuyés par d'anciennes observations indiquant que l'aspirine à long terme améliorait la tolérance au glucose et la glycémie des patients diabétiques de type 2 (Reid et al., 1957). Un traitement quotidien sur deux semaines avec une forte dose d'aspirine améliore la plupart des paramètres glucidiques et lipidiques des patients obèses, néanmoins vu la concentration nécessaire son utilisation en clinique est exclue (Hundal et al., 2002). Cependant l'utilisation de dérivés de salicylates présentant moins d'effets secondaires pourrait être une bonne alternative (Fleischman et al., 2008 ; Goldfine et al., 2008).

Tous ces résultats suggèrent que l'inhibition de la voie IKK/NF- κ B pourrait être une nouvelle stratégie thérapeutique contre l'insulinorésistance et le diabète. Cependant, NF- κ B étant un régulateur important dans l'immunité, des effets indésirables dans le cas de traitement chronique pourraient apparaître

III.4 Rôle des MAP kinases dans la physiopathologie de l'insulinorésistance

De nombreuses études ont rapporté une augmentation de l'activité des MAP kinases dans différents tissus de souris ou de patients atteints de diabète de type 2 et/ou d'obésité. L'activation de ces kinases a été décrite comme fortement impliquée dans le développement de l'insulinorésistance et les dysfonctions des cellules β pancréatiques. Elle participe en effet à l'altération de la voie de signalisation insulinique induite par les cytokines et les acides gras et sont également impliquées dans la production d'agents « diabétogènes » (Zick, 2003).

III.4.1 Les différentes familles des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)

Les Mitogen-Activated Protein Kinases (MAP kinases) constituent une grande famille de protéines kinases activées par de multiples stimuli, tel que les facteurs de croissance, les chocs osmotiques, les radiations UV, mais aussi les cytokines inflammatoires. Elles sont impliquées dans une multitude de processus cellulaires que sont notamment le métabolisme, la régulation génique, la prolifération, la différenciation, la motilité, la survie et la mort cellulaire (Kyriakis and Avruch, 2001 ; Pearson et al., 2001). Par conséquent, les dérégulations de l'activité des MAP kinases sont impliquées dans de nombreuses pathologies, qu'elles soient métaboliques, inflammatoires ou les cancers. De nos jours, les MAP kinases les plus connues et les plus étudiées sont ERK 1/2, JNK 1/2 et p38.

L'activation des MAP kinases nécessite une cascade de phosphorylation qui débute par l'activation des MAP kinase kinase kinase (MAP3K ou MAPKKK ou MEKK). Les MAP3K activés sont capable de phosphoryler les MAP kinases kinases (MAP2K, MAPKK ou MEK) sur des résidus sérine et/ou thréonine, ce qui va permettre leur activation (Symons et al., 2006). Ces MAP2K vont ensuite activer les MAPK par double phosphorylation sur des résidus thréonine et tyrosine. Les MAPK ainsi activées vont phosphoryler de nombreux substrats sur des résidus sérine et/ou thréonine situés à proximité d'un résidu proline (Kolch, 2000) (**Figure 18**). Les MAPK peuvent être inactivées afin de réguler finement leur durée d'activation et donc leurs effets biologiques. Cette inactivation fait intervenir des MAPK phosphatases (MKP) dont l'expression est contrôlée par les MAPK elles même.

Les protéines ERK1 et ERK2 sont exprimées de façon ubiquitaire, elles sont codées par deux gènes différents mais présentent 90% d'homologie (Chen et al., 2001). Suivant le facteur de stimulation, les MAP3K impliquées dans l'activation de ces kinases peuvent être différentes. En effet certaines MAP3K vont intervenir dans la signalisation induite par les facteurs de croissance tandis que d'autres vont être spécifiquement activées par les cytokines. La nature des substrats phosphorylés par ERK1 et ERK2 est très variée ce qui permet d'expliquer l'implication de ces kinases dans divers processus biologiques tels que la prolifération, le développement, la différenciation et la survie cellulaire (Gerits et al., 2007 ; Roux and Blenis, 2004). De même d'autres paramètres tels que le type cellulaire, la nature et l'intensité du stimulus vont intervenir dans l'orientation de la réponse cellulaire (Pouyssegur and Lenormand, 2003). Certaines études permettent d'indiquer que ces deux kinases ne sont pas toujours interchangeables et que certain processus biologiques pourraient être contrôlés spécifiquement soit par ERK1 soit par ERK2. Par exemple ERK2 joue un rôle prépondérant

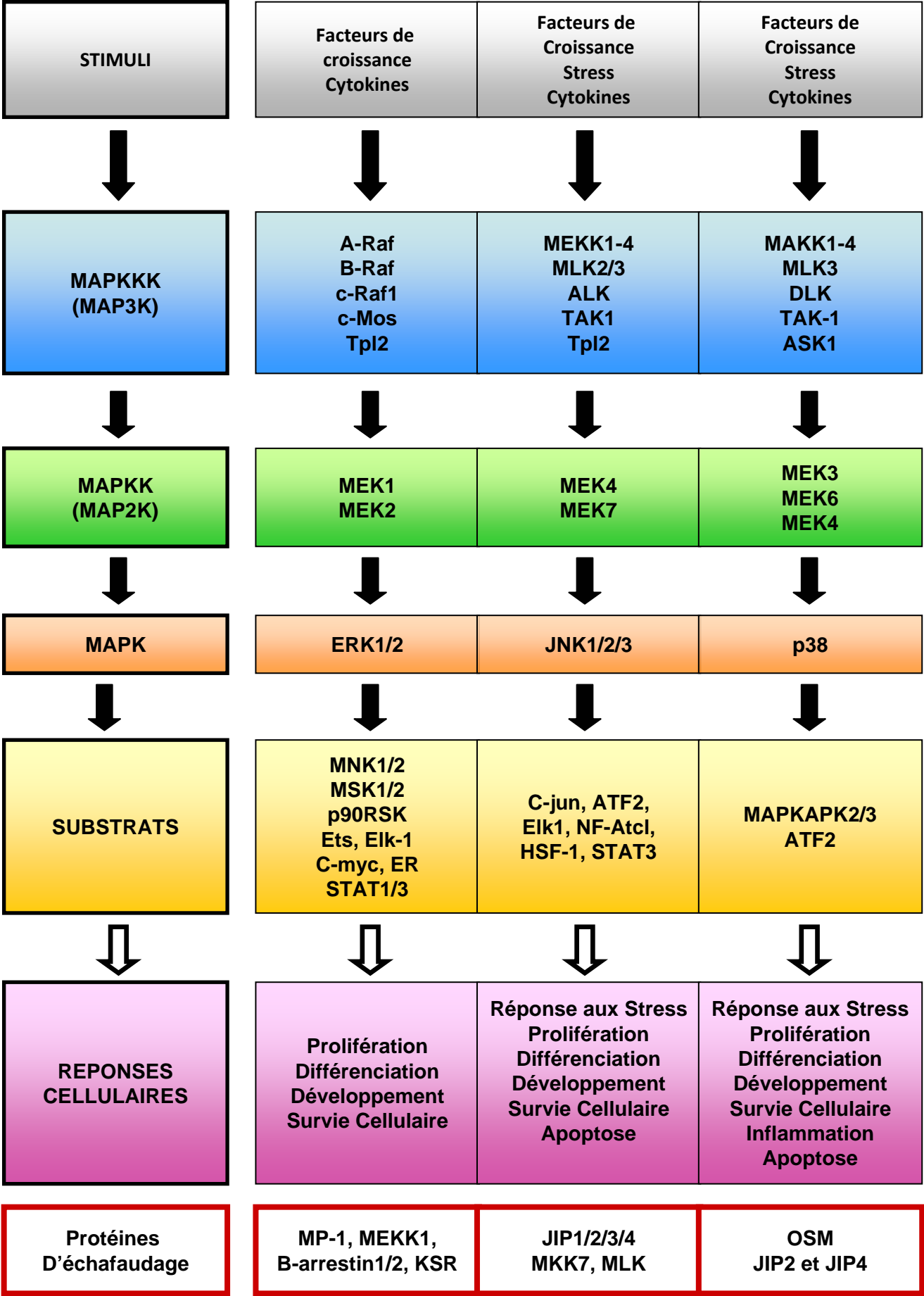


Figure 18 : Voies de signalisation des MAP Kinases

dans la prolifération hépatocytaire ainsi que dans la croissance de certaines cellules tumorales (Bessard et al., 2008 ; Fremin et al., 2007). Par contre ERK1 est un acteur important de la différenciation adipocytaire (Bost et al., 2005b).

Les protéines JNK1 et JNK2 sont exprimées de façon ubiquitaire, elles sont aussi codées par des gènes différents, qui subissent des épissages alternatifs permettant la création d'isoformes. La voie de signalisation des MAP kinases JNK est activée par différents stimuli tels que les cytokines, les irradiations aux UV, la privation en facteurs de croissance ainsi que les stimuli de stress. Après leur activation les JNK peuvent soit rester dans le cytoplasme et activer des substrats cytoplasmiques, soit être relocalisées vers le noyau, où elles vont activer des facteurs de transcription (Waetzig and Herdegen, 2005). Les JNK sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques telles que la régulation de l'apoptose et la survie cellulaire, le contrôle de la morphogenèse embryonnaire ainsi que la régulation de la maturation et de l'activité des lymphocytes T. La dérégulation des JNK est impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires et tumorigéniques (Davis, 2000 ; Imajo et al., 2006). Les kinases p38 également appelées Stress Activated protein Kinase 2 (SAPK2) sont composées de quatre isoformes (α , β , γ et σ). Les p38 α et p38 β sont exprimées de façon ubiquitaire alors que les autres isoformes présentent une expression plus limitée. La voie des MAP kinase p38 peut être activée par une grande variété de stimuli de stress tels que les radiations UV, les chocs thermiques et osmotiques, le LPS, les cytokines pro-inflammatoires, les facteurs de croissance, les ROS, le glucose et les acides gras (Foltz et al., 1997 ; Raingeaud et al., 1995 ; Rouse et al., 1994). De nombreuses études ont montré que ces MAP kinase sont impliquées dans l'inflammation avec un rôle essentiel dans la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF et l'IL-6. Outre son implication dans la production de cytokines inflammatoires, les kinases p38 jouent un rôle important dans les réponses immunitaires notamment *via* la prolifération et la différenciation de cellules du système immunitaire (Ashwell, 2006). Selon les types cellulaires, p38 est impliquée dans la croissance cellulaire ; le processus de différenciation myocytaire, neuronale, adipocytaire, thymocytaire et rénale ; dans les processus de survie et de mort cellulaire ; dans la tumorigénicité et le développement (Aouadi et al., 2006 ; Roux and Blenis, 2004).

III.4.2 Implication des MAP kinases dans l'altération de la signalisation de l'insuline et l'inflammation associée à l'obésité et au diabète

Comme vu précédemment la phosphorylation des IRS sur des résidus sérine est un mécanisme physiologique de régulation négative, activée par l'insuline pour contrôler son propre signal. Cependant les concentrations excessives de cytokines inflammatoires et d'acides gras observées lors de l'obésité induisent des anomalies de sérine phosphorylations au niveau des muscles, du foie et du tissu adipeux aboutissant à une diminution de la réponse insulinaire dans ces tissus (Gual et al., 2005). Les MAP kinases ERK et JNK jouent un rôle important dans ces phosphorylations sur sérine induites par les facteurs inflammatoires. Les phosphorylations induites par les kinases ERK et JNK participent à la déstabilisation de l'interaction entre IRS-1 et le récepteur de l'insuline ainsi qu'entre IRS-1 et la PI3-Kinase (Aguirre et al., 2002 ; Mothe and Van Obberghen, 1996). Par contre, il semble que les kinases p38 ne soient pas capables de phosphoryler directement des résidus sérine d'IRS-1. Associé à la phosphorylation sur sérine, les kinases ERK et p38 sont capables d'induire une diminution de l'expression transcriptionnelle et protéique d'IRS-1 et d'IRS-2, ayant également pour conséquence une inhibition de la signalisation de l'insuline (Fujishiro et al., 2003).

De nombreuses études mettent en évidence l'implication de p38 dans la régulation négative de l'expression du transporteur de glucose GLUT4 (de Alvaro et al., 2004). Mais il semble également que les kinases ERK et JNK pourraient réguler négativement l'expression de GLUT4 lors d'un stimulus avec du $TNF\alpha$ (Emanuelli et al., 2008).

La kinase p38 est capable d'augmenter le niveau d'expression de la lipide phosphatase PTEN. Cette augmentation est la résultante de deux mécanismes complémentaires induits par p38. Le premier mécanisme est l'augmentation de l'expression transcriptionnelle de PTEN *via* l'activation du facteur de transcription ATF-2 (Shen et al., 2006). Le deuxième mécanisme est la stabilisation de PTEN par phosphorylation (Liu et al., 2007).

Les cytokines inflammatoires sont capables d'augmenter *in vitro* la lipolyse dans les adipocytes murins et humains *via* l'activation des kinases ERK et JNK. Les acides gras libres ainsi produits sont capables d'avoir des effets délétères sur la signalisation de l'insuline (Souza et al., 2003 ; Zhang et al., 2002). Le LPS *via* la voie MEK/ERK, est lui aussi capable d'induire la lipolyse *in vivo* et également *in vitro* dans les adipocytes isolés.

L'activation des MAP kinases par les cytokines inflammatoires, mais aussi par d'autres stress métaboliques, est impliquée dans les modifications d'expression de certaines adipokines. Ainsi les kinases JNK sont impliquées dans la diminution d'expression de l'adiponectine et dans la production de MCP-1 (Kim et al., 2005 ; Takahashi et al., 2008). Les ERK sont impliquées dans la diminution de production d'adiponectine et sont des régulateurs majeurs de la production de PAI-1 (Fasshauer et al., 2003 ; Pandey et al., 2005). Les p38 sont impliquées dans l'augmentation de la production de leptine (Trujillo et al., 2006).

Les MAP kinases sont capables de phosphoryler et ainsi diminuer l'activité du facteur de transcription PPAR γ . Ce facteur de transcription contrôle la différenciation et l'expression de nombreux gènes adipocytaires. Des modifications de phosphorylation de PPAR γ pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie de l'insulinorésistance.

L'obésité et le diabète de type 2 sont associés à une augmentation de la concentration en glucose, une augmentation de certaines cytokines inflammatoires, une augmentation de l'infiltration des îlots pancréatiques par des macrophages, et d'une apoptose des cellules β (Donath and Shoelson, 2011). Le glucose présent en excès peut induire des stress oxydatifs qui s'accompagnent à long terme d'une altération et de l'apoptose des cellules β -pancréatiques. L'inhibition de JNK protège les îlots β -pancréatiques de l'apoptose induite par de fortes concentrations en glucose, tandis que les kinases ERK et p38 ne semblent pas être activées par le glucose (Bennett et al., 2003 ; Bonny et al., 2001). A l'inverse, dans les cellules β -pancréatiques toutes les MAP kinases sont activées par les cytokines et impliquées dans l'apoptose induite par celles-ci. Les kinases p38 semble également intervenir dans les effets inhibiteurs des cytokines sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans les cellules β -pancréatiques (Larsen et al., 1998). Une activation anormale des MAP kinases lors de l'obésité pourrait donc être impliquée dans la dérégulation de la production d'insuline et l'apoptose des cellules β -pancréatiques, ce qui participerait au développement du diabète de type 2.

Il est important de souligner que l'activation des MAP kinases n'a pas que des effets délétères sur les cellules β -pancréatiques. En particulier, les kinases ERK sont des médiateurs positif du glucose sur la survie de ces cellules, sur la transcription du gène de l'insuline ainsi que dans la sécrétion de l'hormone (Khoo et al., 2004).

Il est intéressant de noter que les nombreux facteurs inflammatoires augmentés lors de l'obésité tels que le LPS, les acides gras non estérifiés ainsi que les cytokines sont impliqués dans l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF α et l'IL-6 au niveau des macrophages et des adipocytes. Et l'activation des MAP kinases ERK et JNK semble nécessaire à la production de ces cytokines.

III.4.4 Apports des animaux génétiquement modifiés dans l'implication des MAP kinases dans la physiopathologie de l'insulinorésistance

III.4.4.1 Les souris génétiquement modifiées pour la voie ERK

L'activité des kinases ERK est augmentée dans les adipocytes isolés ainsi que dans les cultures primaires de myotubes de patients atteints de diabète de type 2 (Bouzakri et al., 2003; Carlson et al., 2003). De plus l'activité des kinases ERK est significativement plus élevée dans le tissu adipeux de souris mises sous régime hyperlipidique, devenues obèses et résistantes à l'insuline (Bost et al., 2005a). Ces données suggèrent une implication des kinases ERK dans le développement de l'insulinorésistance *in vivo*, ce qui est confirmé par l'étude de différents modèles animaux transgéniques.

L'étude des souris invalidées pour l'isoforme ERK1 a mis en évidence l'implication de cette kinase dans le développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline. En effet, les souris ERK1^{-/-} sont résistantes à la prise de poids induite par un régime hyperlipidique (Bost et al., 2005b). Ce phénotype peut être en partie expliqué par une altération de l'adipogenèse puisque les souris ERK1^{-/-}, même sous régime standard, ont des dépôts adipeux sous-cutanés et épидидymaires significativement diminués par rapport aux souris sauvages, et présentent une diminution du nombre de pré-adipocytes. En plus de l'altération de l'adipogenèse, les souris ERK1^{-/-} ont une dépense énergétique postprandiale augmentée par rapport aux souris sauvages, ainsi la somme de ces deux paramètres participerait à la diminution du développement du tissu adipeux et de l'obésité de ces souris. Comme on pourrait l'attendre, l'absence de prise de poids des souris ERK1^{-/-} s'accompagne d'une meilleure tolérance au glucose et à l'insuline par rapport aux souris sauvages. A l'inverse, les souris invalidées pour la protéine p62, un inhibiteur de la voie de signalisation des MAP kinases ERK, développent au bout de quelques mois une obésité sévère, l'apparition d'une résistance à l'insuline avec

une diminution de la dépense énergétique et une augmentation de l'adipogenèse (Rodriguez et al., 2006). Avant l'apparition de l'obésité, les souris $p62^{-/-}$ ne présentent pas de modification de la sensibilité à l'insuline. Ce phénotype est probablement dû à l'augmentation de l'expression de ERK1, car la délétion de ces kinase dans les souris $p62^{-/-}$ reverse les phénotypes décrit précédemment (Lee et al., 2010). Ces études mettent en évidence l'implication d'ERK1 dans le développement de l'obésité sans déterminer si ERK1 peut moduler la sensibilité à l'insuline indépendamment de son effet sur la prise de poids. De manière intéressante l'inactivation de ERK1 protège les souris *ob/ob* de l'insulinorésistance et de l'inflammation du tissu adipeux sans effets sur le poids (Jager et al., 2010). Cette étude démontre clairement que les effets bénéfiques de l'inactivation d'ERK1 sont indépendants de la perte de poids.

Aucune étude *in vivo* ne concerne la kinase ERK2 car l'inactivation génétique de cette isoforme est létale au stade embryonnaire.

III.4.4.2 Les souris génétiquement modifiées pour la voie JNK

L'activité total des JNK est augmentée dans le foie, le tissu adipeux et les muscles de souris obèses et insulinorésistantes, suggérant une implication de cette voie de signalisation dans le développement de l'insulinorésistance (Hirosumi et al., 2002). Parmi les différentes isoformes de JNK, l'inactivation de la kinase JNK1 s'est révélée être la plus importante sur l'insulinorésistance.

Les souris invalidées pour JNK1 ont une prise de poids inférieure aux souris sauvages que ce soit sous régime normal ou riche en graisses. Les souris $JNK1^{-/-}$ soumises à un régime riche en graisses présentent une masse adipeuse totale inférieure aux souris sauvages avec une diminution de la taille des adipocytes. De manière étonnante, ces souris $JNK1^{-/-}$ ont également une redistribution des dépôts adipeux avec une diminution des dépôts sous-cutanés et une augmentation des viscéraux (Hirosumi et al., 2002). Leur glycémie et insulinémie à jeun sont diminuées, tandis que leur sensibilité à l'insuline est améliorée et le niveau plasmatique d'adiponectine est augmenté. De même, l'inactivation de JNK1 dans les souris obèses *ob/ob* permet de diminuer la masse corporelle, la glycémie, l'insulinémie et l'insulinorésistance. Des études avec des souris invalidées pour JIP-1, une protéine d'échafaudage des kinases JNK, présentent un phénotype très similaire aux souris $JNK1^{-/-}$. Sous régime riche en graisses, ces souris sont protégées de la prise de poids, ont une

meilleure sensibilité à l'insuline par rapport aux souris sauvages (Jaeschke et al., 2004). Cependant, les souris JIP-1^{-/-} ne semblent pas être protégées de la résistance à l'insuline, ce qui peut être dû à l'absence basale d'expression de JIP-1 dans le foie et donc son indépendance dans l'activation de la voie des JNK dans cet organe. Il est intéressant de noter qu'une mutation de l'homologue humain de JIP-1 a été mise en évidence chez des patients ayant développés une forme génétique rare de diabète de type 2 (Waeber et al., 2000). Ces données suggèrent que les kinases JNK jouent un rôle important dans la résistance à l'insuline et le développement du diabète de type 2 chez l'homme, ainsi qu'une forte implication de ces kinases dans le métabolisme hépatique.

Contrairement aux souris JNK1^{-/-}, les souris JNK2^{-/-} ne sont pas protégées de l'obésité et de l'insulinorésistance lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en graisses (Hirosumi et al., 2002). Ce qui provient certainement du fait que JNK1 est l'isoforme prédominante dans le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique, et qu'elle pourrait compenser l'invalidation de JNK2. En effet l'invalidation de JNK2 dans des souris hétérozygotes pour JNK1 conduit à une diminution de la prise de poids et de la résistance à l'insuline induites par un régime hyperlipidique (Tuncman et al., 2006). Cette étude met en évidence la participation de JNK2 dans le développement de l'insulinorésistance et l'existence d'une compensation entre JNK1 et JNK2.

Les souris JNK1^{-/-} présentent une diminution des paramètres inflammatoires induits par un régime hyperlipidique, ce qui suggère que l'activité des JNK dans les cellules myéloïdes pourrait participer au développement de l'insulinorésistance. Dans cette optique, plusieurs études montrent que les souris invalidées pour JNK1 spécifiquement dans les cellules myéloïdes ou hématopoïétiques sont partiellement protégées de l'inflammation induite par un régime riche en graisses. Cependant, certaines études montrent que cela s'accompagne d'une amélioration de l'insulinorésistance (Han et al., 2013; Solinas et al., 2007) alors que d'autres ne confirment pas ce résultat bien que l'inflammation du tissu adipeux soit diminuée (Sabio et al., 2008; Vallerie et al., 2008). Les différences retrouvées entre ces deux études pourraient provenir des différences dans les protocoles de transfert de moelle, et dans la durée et/ou l'âge d'initiation des régimes.

Les différences entre ces deux études laissent supposer l'implication de JNK1 au sein d'autres tissus dans le développement de l'inflammation et dans la résistance à l'insuline, que ce soit au niveau systémique ou localement.

L'activation de JNK1 dans les hépatocytes semble avoir un rôle protecteur, comme l'indique l'étude des souris invalidées pour JNK1 spécifiquement dans les hépatocytes. En effet, ces souris développent une résistance à l'insuline, une intolérance au glucose et une stéatose hépatique même sous régime standard (Sabio et al., 2009). Ces résultats sont en désaccord avec une autre étude qui démontre que l'invalidation de JNK1 dans le foie entier, par l'utilisation d'ARN interférents, améliore la glycémie, l'insulinémie et la signalisation insulinique hépatique des souris obèses sous régime riche en graisses (Yang and Trevillyan, 2008). Ces deux études suggèrent que l'invalidation de JNK1 dans les hépatocytes est délétère alors que l'invalidation combinée de JNK1 dans les hépatocytes ainsi que dans les autres cellules du foie a des effets protecteurs. A l'inverse la surexpression de JNK1 dans le foie de souris sauvages diminue la sensibilité à l'insuline de ces souris.

Dans les muscles, l'activation des kinases JNK semble avoir un effet mineur sur les niveaux de glycogène et sur l'expression des protéines clé du métabolisme du glucose, suggérant que les effets bénéfiques de l'invalidation de JNK1 ne soit pas les conséquences directes de l'invalidation de JNK1 dans les muscles (Fujii et al., 2004 ; Witczak et al., 2006).

III.4.5 Apports des inhibiteurs pharmacologiques dans l'implication des MAP kinases dans la physiopathologie de l'insulinorésistance

L'ensemble des études basées sur l'utilisation de modèles animaux suggère que les voies de signalisation des MAP kinases pourraient être des cibles pharmacologiques intéressantes pour le traitement de l'insulinorésistance et du diabète de type 2. Parmi tous les inhibiteurs pharmacologiques des MAP kinases, seuls ceux dirigés contre les JNK ont fait l'objet de test pour leurs effets sur le traitement des pathologies précédemment citées.

Une première génération d'inhibiteurs compétitifs de l'ATP, montre des effets protecteurs contre la résistance à l'insuline. En effet, le traitement de souris *db/db* obèses et diabétiques avec l'inhibiteur CC105 (Celgene Corporation) diminue significativement la glycémie, augmente la tolérance au glucose et la production d'insuline en réponse au glucose (Bennett et al., 2003). Néanmoins ces inhibiteurs présentent une spécificité limitée qui remet ainsi en question l'implication des JNK dans les effets observés (Bogoyevitch and Arthur, 2008). D'autres inhibiteurs plus spécifiques montrent également des effets bénéfiques, il reste

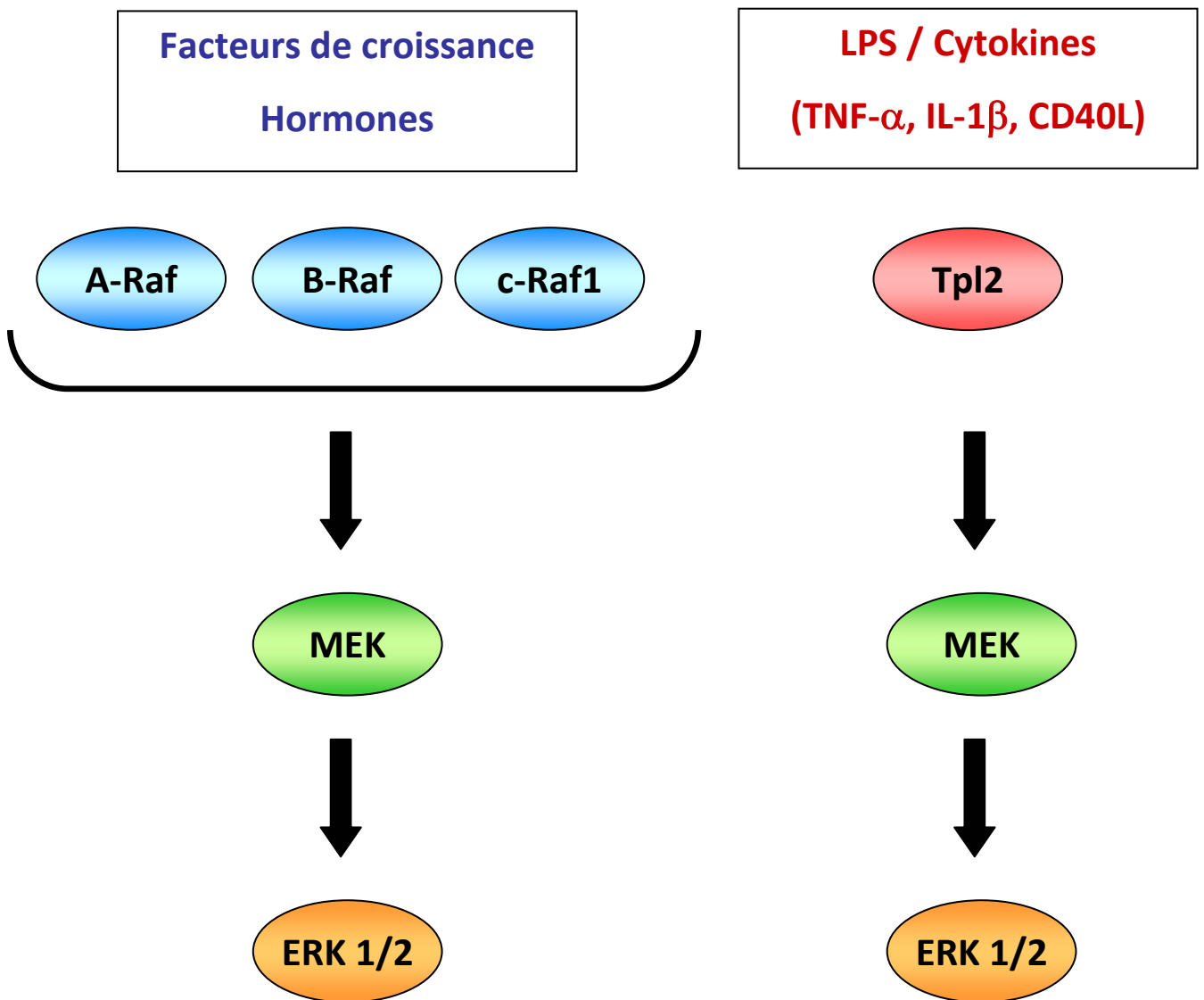


Figure 19 : La MAP3K Tpl2 est spécifiquement activé par des stimuli inflammatoires

Les facteurs de croissance et les hormones vont activées les MAP kinases ERK suite à l'activation des MAP3K A-Raf, B-Raf ou c-Raf1 tandis que les stimuli inflammatoires tels que le LPS ou les cytokines vont activer les kinases ERK suite à l'activation de la MAP3K Tpl2.

quand même à démontrer l'implication des JNK dans leurs effets (Liu and Rondinone, 2005 ; Zhao et al., 2006).

Une famille d'inhibiteurs a été développée qui n'entrent pas en compétition avec l'ATP mais qui empêchent l'interaction des JNK avec les protéines d'échafaudage tel que JIP-1. Un de ces inhibiteurs semble également avoir des effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline des souris *db/db*.

Ces résultats indiquent que les MAP kinases sont des cibles intéressantes pour lutter contre l'insulinorésistance et le diabète de type 2. Cependant, ces kinases sont impliquées dans de nombreux processus biologiques et leur inhibition pourrait avoir un certain nombre d'inconvénients et ainsi être un obstacle à leur utilisation. Une autre alternative serait de cibler des protéines contrôlant l'activité de ces kinases spécifiquement suivant les stimuli. Dans cette idée, des candidats potentiels seraient les MAP3K impliquées par exemple dans l'activation des MAP kinases en réponse aux stress inflammatoires observés lors de l'obésité.

III.5 La MAP3Kinase Tpl2 : une cible potentielle pour le traitement des maladies inflammatoires

III.5.1 Généralités

Les MAP kinases sont associées à une multitude d'effets biologiques différents, qui peuvent s'expliquer par la diversité des voies de signalisation situées en aval et notamment l'activation des MAP3K. En effet chaque MAP3K va être activée par des stimuli qui lui sont propres, ce qui permet d'orienter la transmission du signal d'activation et la réponse biologique en fonction du stimulus (Figure 18). La protéine Tpl2 (Tumor Progression Locus 2, aussi appelée Cot pour Cancer Osaka Thyroïde) est une sérine-Thréonine MAP3K (Erny et al., 1996). Tpl2 est spécifiquement activée par les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-1 β ou le CD40L mais aussi par les agonistes de récepteurs TLR tel que le LPS (Cho et al., 2005 ; Eliopoulos et al., 2003). En effet dans les adipocytes Tpl2 n'est pas impliquée dans l'activation des MAP kinases ERK induite par des facteurs de croissance telle que l'insuline (Jager et al., 2010) (**Figure 19**).

Tpl2 n'est pas exprimée de manière équivalente entre les différents tissus (Ohara et al., 1993). Cette kinase est majoritairement exprimée dans les cellules de l'immunité innée et acquise, suggérant qu'elle jouerait un rôle important dans les phénomènes d'activation de ces cellules et dans la libération de cytokines pro-inflammatoires. De plus Tpl2 est capable d'activer les différentes MAP kinases de manière spécifique suivant le type cellulaire. Par exemple dans les macrophages en réponse à des stimuli inflammatoires, Tpl2 est impliquée dans l'activation des kinases ERK et JNK tandis que dans les adipocytes Tpl2 contrôle uniquement l'activation de ERK. Tpl2 est impliquée dans de nombreux cancers, lorsqu'elle est surexprimée, elle gouverne la prolifération de certaines lignées cellulaires de tumeurs (Patriotis et al., 1993). A l'inverse, Tpl2 est aussi décrite comme suppresseur de tumeur dans d'autres cas de cancers dont celui du poumon (Gkirtzimanaki et al., 2013).

De manière tout à fait intéressante la MAP3K Tpl2 est retrouvée surexprimée dans le tissu adipeux des modèles murins obèses mais aussi dans des biopsies de tissu adipeux de patients à différents stades d'obésité (Jager et al., 2010). Ce qui laisse supposer l'implication de Tpl2 dans l'inflammation et la résistance du tissu adipeux lors de l'obésité et du diabète.

III.5.2 Structure de Tpl2 et mécanismes d'action

Le gène de Tpl2 code pour 2 isoformes de la protéine, l'une de 58kDa (Tpl2 long, TPL2_L) et l'autre de 52kDa (Tpl2 short, Tpl2_S) qui sont issues de la présence de 2 sites alternatifs d'initiation de traduction (Ohara et al., 1993). Entre l'Homme et les rongeurs la séquence d'acides aminés de Tpl2 présente 94% d'homologie rendant ainsi de nombreuses études murines adaptables à l'Homme. La partie N-terminale de Tpl2 a une fonction qui reste encore inconnue, à l'inverse la partie C-terminale joue un rôle important dans la régulation de l'activité catalytique et dans la stabilisation de la protéine (Gandara et al., 2003). Tpl2 possède également un domaine d'activité kinase sur des résidus sérine-thréonine formé par un lobe N et un lobe C reliés entre eux par une boucle appelée « hinge region ». C'est dans cette région que se fait l'interaction avec l'ATP, nécessaire à l'activation de Tpl2.

A l'état de basal, la totalité du pool de protéines Tpl2 est associé *via* sa région C-terminale à la protéine p105 NF- κ B (ou I κ B α (Inhibiteur de NF- κ B)) et à la protéine ABIN2, procurant une grande stabilité à Tpl2 mais la rendant incapable d'activer ses substrats. En effet, p105 interagit également avec le domaine kinase de Tpl2 et pourrait même servir de substrat de

substitution, ce qui empêche par conséquent son interaction de Tpl2 avec ses substrats tel que MEK (Babu et al., 2006 ; Beinke et al., 2003). Une forme tronquée de Tpl2 en C-terminal n'est plus capable d'interagir avec la protéine p105 et donc n'est plus maintenue inactive ce qui la rend constitutivement active. La protéine ABIN2, qui est associée à Tpl2 en état de base, est impliqué dans sa stabilisation mais ne semble pas être nécessaire pour son activation (Lang et al., 2004).

En réponse à un stimulus, p105 qui est associé avec Tpl2 est phosphorylé par la kinase IKK β entraînant sa dégradation par le protéasome. Sa dégradation va permettre d'une part la libération de Tpl2 et d'autre part la libération de NF- κ B qui va alors transloquer dans le noyau (Waterfield et al., 2004). D'autre part, certains complexes p105 sont porcessés pour donner la forme p50 de NF- κ B (Beinke et al., 2004). Lors d'un stimulus seul la forme longue de Tpl2 se dissocie de la protéine p105. Une fois Tpl2 libre, IKK β va la phosphoryler sur la Thr²⁹⁰, ce qui va participer à sa stabilité et à son activation (Cho and Tsichlis, 2005). Tpl2 peut également être phosphorylé dans sa région C-terminale par la voie PI3K-AKT, et d'autres sites tels que la Ser⁴⁰⁰ et la Ser⁶² semblent nécessaires pour la pleine activation de Tpl2 (Robinson et al., 2007 ; Stafford et al., 2006). Tpl2 est potentiellement capable d'activer indirectement l'ensemble des MAP kinases (Chiariello et al., 1999). Dans certaines conditions, Tpl2 peut également transloquer dans le noyau et réguler l'activité de facteurs de transcription comme c-FOS, AP-1 ou encore NF- κ B (Choi et al., 2008). Cependant, lorsque Tpl2 actif et dissocié de p105, son expression est très instable car il est rapidement dégradé par le système ubiquitine-protéasome. Ce mécanisme permet d'empêcher une activation prolongée des MAP kinases.

III.5.3 Implication de Tpl2 dans l'inflammation et la prolifération cellulaire

De nombreuses études montrent que Tpl2 joue un rôle central dans les phénomènes inflammatoires, à la fois en étant activé par des cytokines pro-inflammatoires et en induisant la production de cytokines pro ou anti-inflammatoires (Perfield et al., 2011).

Différents stimuli sont capables d'activer Tpl2, c'est le cas de certains stress cellulaires (Stress génotoxiques, osmotiques ou oxydatifs), les ligands des TLR (Toll-Like Receptor) ou du CD40, certains récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ou encore certaines cytokines (Cho et al., 2005 ; Das et al., 2005 ; Eliopoulos et al., 2003). Cependant en fonction du type

cellulaire et du stimulus, Tpl2 peut induire des voies de signalisation très variées. En effet, dans les macrophages, la phosphorylation de p38 implique Tpl2 lorsque ceux-ci sont stimulés par le TNF α , alors qu'elle est indépendante de Tpl2 lorsqu'ils sont stimulés par les LPS (Das et al., 2005). Dans de nombreux autres types cellulaires, le TNF α induit la phosphorylation de p38 indépendamment de Tpl2. Toujours dans les macrophages, l'activation de Tpl2 par l'IL-1 β ne phosphoryle que les kinases ERK, et n'affecte pas la phosphorylation de JNK et p38. Dans les adipocytes murins 3T3-L1 Tpl2 est impliqué dans l'activation des kinases ERK en réponse à l'IL-1 β et au TNF α (Jager et al., 2010).

Outre l'activation de Tpl2, et des voies métaboliques qui y sont associées, par des stimuli inflammatoires, cette MAP3K est impliquée dans la production de facteurs inflammatoires. Ainsi dans les macrophages, Tpl2 est impliqué, *via* un mécanisme dépendant des ERK dans la synthèse de TNF α induite par des agents bactériens comme le LPS. Ce processus est indépendant de l'activation de JNK, p38 et NF- κ B (Dumitru et al., 2000). Tpl2 gouverne la production de TNF α au travers de deux effets : d'une part il régule le transport de l'ARNm du pré-TNF du noyau vers le cytoplasme, d'autre part il régule la maturation du pré-TNF en TNF *via* la phosphorylation de la protéine TACE (Rousseau et al., 2008). Lorsque les macrophages ou les cellules dendritiques sont stimulés par les LPS (liaison sur le TLR4) ou le dinucléotide CpG (liaison sur le TLR9), l'activation de Tpl2 gouverne la libération de l'IL-1 β et de l'IL-10 (Kaiser et al., 2009; Mielke et al., 2009). Dans les cellules T activées lors d'une infection, Tpl2 augmente la production d'IFN γ et diminue la sécrétion de l'IL-12 (Sugimoto et al., 2004).

Tpl2 participe également à la production de prostaglandines PGE₂ par les macrophages, induite par une stimulation au LPS (Eliopoulos et al., 2002). Les PGE₂ sont produites par COX-2 (Cyclo-Oxyenase 2) qui est augmentée *via* la voie Tpl2/ERK.

Tpl2 est également impliqué dans de nombreux cancers, avec des effets pro-cancéreux pour certains et des effets anti-cancéreux pour d'autres. Une étude indique que Tpl2 est associé et participe aux capacités métastatiques des cellules de carcinome rénal, *via* sa potentielle régulation de l'axe CXCL12 – CXCR4 (Lee et al., 2013a). Dans les cellules cancéreuses de la prostate, Tpl2 est retrouvé surexprimé dans les cellules devenues androgène-indépendantes, et participerait également à leur prolifération (Jeong et al., 2011). A l'inverse, Tpl2 est décrit comme suppresseur de cancer au niveau du poumon, et sa faible

expression est corrélée avec une diminution de la survie des patient et souris atteints de cancer du poumon (Gkirtzimanaki et al., 2013).

Des études *in vitro* mettent en évidence l'implication de Tpl2 dans le phénomène de migration cellulaire de cellules cancéreuses. Pour cela Tpl2 participe à la signalisation du Ca^{2+} mais aussi à l'activation de Rac1 et des kinases d'adhésion focale qui sont requis pour la réorganisation du cytosquelette d'actine et la migration cellulaire (Hatziapostolou et al., 2011; Hatziapostolou et al., 2008).

III.5.4 Conséquences de l'invalidation de Tpl2 chez la souris

Malgré son implication dans de nombreux mécanismes cellulaires, les souris invalidées pour la kinase Tpl2 sont viables et ne présentent pas de phénotypes évident (Dumitru et al., 2000).

Etant donné la participation de Tpl2 dans la production de certains facteurs inflammatoires, de nombreuses études *in vivo* ont mis en évidence l'implication de cette kinase dans des pathologies inflammatoires. C'est ainsi que les souris invalidées pour Tpl2 traitées avec du LPS, sont protégées du choc septique résultant principalement de la production de $TNF\alpha$, d'IL-6 et de MCP-1 par les macrophages. Elles sont également protégées contre le développement de la maladie de Crohn induite par la surexpression du $TNF\alpha$ (Kontoyiannis et al., 2002). Dans un modèle d'induction de pancréatite par la céruléine, Tpl2 participe à l'activation de JNK, ERK et du facteur de transcription AP-1, ainsi qu'à l'augmentation de l'expression des protéines chimio-attractantes IL-6, MIP-2 et MCP-1. L'activation de toutes ces voies converge pour induire l'infiltration du pancréas par des cellules immunitaires et donc à la pancréatite. Les souris invalidées pour Tpl2 sont ainsi partiellement protégées des phénomènes inflammatoires du pancréas et des poumons associés à la pancréatite aiguë (Van Acker et al., 2007). Des souris $Tpl2^{-/-}$ traitées en intranasal avec de l'ovalbumine développent une inflammation bronchoalvéolaire plus importante que les souris sauvages. Ce qui est expliqué par une augmentation du nombre d'éosinophiles dans les alvéoles des bronches, et une différence dans la balance Th1/Th2 des cellules T chez les souris invalidées pour Tpl2. En effet, Tpl2 étant décrit pour participer à la différenciation des cellules T en Th1, on observe alors une diminution des Th1 et une augmentation des Th2 (Watford et al., 2010). Jouant un rôle important dans l'immunité, les souris invalidées pour Tpl2 se trouvent

être plus sensibles à l'infection par certains pathogènes, et c'est le cas lors d'une infection par *Listeria Monocytogenes* et *Toxoplasma gondii*. Les souris Tpl2^{-/-} succombent plus rapidement que les souris sauvages, ce qui s'explique par l'augmentation de la production d'IL-12 et une diminution de l'IFN γ dans ces souris (Mielke et al., 2009 ; Watford et al., 2008). Une étude récente implique *in vivo* Tpl2 dans la migration des macrophages dans la cavité péritonéale induite par le thioglycollate, notamment en régulant l'expression de certains récepteurs aux chimiokines (Rowley et al., 2014).

L'ischémie reperfusion induit d'importants effets délétères au niveau des fonctions rénales, dues à l'augmentation de la concentration en TNF α et une augmentation de l'apoptose. Les souris Tpl2^{-/-} démontrent une diminution des effets délétères induits par l'ischémie reperfusion, cependant de manière étonnante la production de TNF α , l'activation des MAP kinases et l'infiltration des reins par des neutrophiles sont équivalentes aux souris sauvages. L'amélioration observée chez les souris Tpl2^{-/-} ne s'explique donc pas par une diminution de l'inflammation mais par une diminution de l'apoptose avec une activité de la caspase 3 réduite (Yaomura et al., 2008).

Lors de traitements chimiques induisant des carcinomes, les souris Tpl2^{-/-} présentent davantage d'inflammation que les souris sauvages, avec une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de l'infiltration de neutrophiles. Cette inflammation participe au développement des cancers de la peau, ainsi les souris Tpl2^{-/-} présentent près de quatre fois plus de cancers que les souris sauvages (Decicco-Skinner et al., 2011). Dans un autre modèle d'induction de tumeurs par mutations génétiques, les souris Tpl2^{-/-} présentent également une incidence plus élevée de développement de cancers intestinaux. Ces cancers sont aussi liés à une augmentation de l'inflammation qui est cette fois-ci due à une diminution de la production de cytokines anti-inflammatoires et une diminution des cellules T régulatrices (Serebrennikova et al., 2012). Dans ces deux modèles, Tpl2 possède donc des propriétés anti-inflammatoires et suppresseur de tumeur.

Présentation du projet de thèse

L'importance de Tpl2 dans l'inflammation, nous a conduits à déterminer si elle pouvait jouer un rôle dans l'inflammation du tissu adipeux et l'insulinorésistance associées à l'obésité. Les travaux de l'équipe avaient mis en évidence que Tpl2 était surexprimé dans le tissu adipeux de souris et patients obèses et que cette kinase participait aux effets délétères des cytokines inflammatoires sur la physiologie des adipocytes (Jager et al., 2010) .

Les objectifs de cette thèse ont été :

- De déterminer l'implication de Tpl2 dans les interactions entre adipocytes et macrophages
- De déterminer si Tpl2 pouvait contribuer à l'inflammation et à l'insulinorésistance induites par des dérivés de la flore bactérienne en particulier les LPS.
- D'identifier des médiateurs pro-inflammatoires dont la production par les adipocytes était sous le contrôle de Tpl2.
- De déterminer si Tpl2 pouvait contrôler la production de chimiokines dans les adipocytes et contribuer ainsi à l'attraction des macrophages dans le tissu adipeux
- D'étudier si l'hypoxie activait Tpl2 dans les adipocytes et les macrophages et les conséquences sur la réponse inflammatoire.

RESULTATS

Article n°1

**Implication of the Tpl2 kinase in the inflammatory changes
and insulin resistance induced by the interaction between adipocytes
and macrophages**

Ceppo F., Berthou F., Jager J., Dumas K., Cormont M., Tanti JF

Endocrinology, 2014, 155(3):951–964

Objectifs

Lors de l'obésité, l'inflammation du tissu adipeux participerait activement au développement de la résistance à l'insuline. Cette inflammation du tissu adipeux est la résultante d'une hypertrophie et d'une modification métabolique des adipocytes et de l'infiltration de cellules immunitaires tel que les macrophages. Il est suggéré qu'au sein du tissu adipeux d'individus obèses il existe un dialogue entre les adipocytes et les macrophages. Ce dialogue aboutirait à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le $\text{TNF-}\alpha$, l' $\text{IL-1}\beta$ et l' IL-6 , à une résistance à l'insuline au niveau des adipocytes mais également au niveau systemique. L'augmentation des taux circulants du LPS et des acides gras saturés retrouvés lors de l'obésité participeraient également à la mise en place d'une boucle paracrine inflammatoire entre les macrophages et les adipocytes. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'implication de la MAP3K Tpl2 dans cette boucle inflammatoire et les conséquences de son inhibition. La kinase Tpl2 est activée par des stimuli inflammatoires tel que les cytokines et le LPS, et de manière intéressante son expression est retrouvée augmentée dans le tissu adipeux de souris et d'hommes obèses. Le laboratoire a montré qu'au niveau des adipocytes la voie Tpl2-ERK était impliquée dans la lipolyse et l'altération de l'insuline induites par le $\text{TNF-}\alpha$ et l' $\text{IL-1}\beta$.

Nous avons donc voulu déterminer le rôle de Tpl2 dans le dialogue entre les adipocytes et les macrophages, sur la production de cytokines, la lipolyse et la signalisation de l'insuline. Pour cela nous avons utilisé comme modèles expérimentaux des co-cultures entre adipocytes et macrophages, et des milieux conditionnés de macrophages stimulés au LPS.

Résultats

La co-culture entre des adipocytes et des macrophages est capable de mimer un état inflammatoire. En effet, on observe l'augmentation de l'expression et de la production de cytokines inflammatoires ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , PAI-1 et MCP-1) ainsi que l'augmentation de la lipolyse. De manière intéressante, l'inhibition pharmacologique de Tpl2 dans ce modèle permet de diminuer l'expression et la production de ces facteurs inflammatoires et la lipolyse (Figure 1 et 3). Ces effets bénéfiques de l'inhibition de Tpl2 pourraient être partiellement dus à une diminution de la proportion de macrophages inflammatoires (type

M1) sans avoir d'effets sur la proportion de macrophages plus anti-inflammatoires (type M2) (Figure 2). L'utilisation d'ARN interférents nous permis de mettre en évidence que Tpl2 au sein des macrophages avait une plus grande implication dans l'expression et la production de ces facteurs inflammatoires par rapport à Tpl2 dans les adipocytes (Figure 4, 5 et supp 1).

Ajouté à l'effet inflammatoire, la co-culture induit une résistance à l'insuline des adipocytes qui est partiellement restaurée lors de l'inhibition pharmacologique de Tpl2. Cette résistance à l'insuline se traduit par une diminution protéique d'IRS-1 et la diminution de phosphorylation de la protéine PKB ; ces effets sont partiellement reversés lorsqu'on invalide Tpl2 dans les macrophages tandis qu'aucun effet significatif n'est retrouvé lors de l'invalidation de Tpl2 dans les adipocytes (Figure 6).

L'augmentation du LPS dans la circulation suite à la modification de la flore intestinale est un élément important dans l'inflammation du tissu adipeux, en participant à l'activation des macrophages. Lorsque les adipocytes sont incubés avec un milieu conditionné de macrophages stimulés avec une concentration de LPS proche de celle observée dans la circulation d'individus obèses, on observe une diminution des niveaux protéiques d'IRS-1 qui s'accompagne d'une diminution de la phosphorylation de PKB induite par l'insuline. On observe également au niveau des adipocytes une augmentation de l'expression des cytokines IL-6 et PAI-1 et de la chimiokine MCP-1. SOCS3, décrit pour altérer la signalisation de l'insuline en interagissant avec le récepteur de l'insuline et les IRS, est elle aussi augmentée par le milieu conditionné de macrophage. A l'inverse, lorsque les adipocytes sont stimulés par un milieu conditionné de macrophages dans lesquels Tpl2 a été inhibé soit par l'inhibiteur pharmacologique soit par l'utilisation d'ARN interfèrent, on observe une réversion partielle de tous les paramètres précédemment cités (Figure 7 et 8).

Conclusion

Cette étude permet de mettre en évidence l'implication de Tpl2 dans l'inflammation et l'insulino-résistance induites par le dialogue entre les adipocytes et les macrophages. De manière tout à fait intéressante l'inhibition pharmacologique de Tpl2 permet de diminuer la production de facteurs inflammatoires mais également de restaurer partiellement la signalisation de l'insuline. L'utilisation d'ARN interférents indique que l'inflammation est majoritairement contrôlée par les macrophages, et que l'inhibition de Tpl2 permet de

réduire la production de facteurs inflammatoires et donc de restaurer la signalisation de l'insuline dans les adipocytes.

D'autre part, on observe que le LPS participe à l'activation de voies inflammatoires dans le tissu adipeux, par des cascades de signalisation dépendantes de Tpl2.

Implication of the Tpl2 Kinase in Inflammatory Changes and Insulin Resistance Induced by the Interaction Between Adipocytes and Macrophages

Franck Ceppo, Flavien Berthou, Jennifer Jager, Karine Dumas, Mireille Cormont, and Jean-François Tanti

INSERM Unité 1065/Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M) and Université de Nice Sophia Antipolis (F.C., F.B., J.J., K.D, M.C., J.-F.T.), F-06204, Nice, France

Adipose tissue inflammation is associated with the development of insulin resistance. In obese adipose tissue, lipopolysaccharides (LPSs) and saturated fatty acids trigger inflammatory factors that mediate a paracrine loop between adipocytes and macrophages. However, the inflammatory signaling proteins underlying this cross talk remain to be identified. The mitogen-activated protein kinase kinase kinase tumor progression locus 2 (Tpl2) is activated by inflammatory stimuli, including LPS, and its expression is up-regulated in obese adipose tissue, but its role in the interaction between adipocytes and macrophages remains ill-defined. To assess the implication of Tpl2 in the cross talk between these 2 cell types, we used coculture system and conditioned medium (CM) from macrophages. Pharmacological inhibition of Tpl2 in the coculture markedly reduced lipolysis and cytokine production and prevented the decrease in adipocyte insulin signaling. Tpl2 knockdown in cocultured adipocytes reduced lipolysis but had a weak effect on cytokine production and did not prevent the alteration of insulin signaling. By contrast, Tpl2 silencing in cocultured macrophages resulted in a marked inhibition of cytokine production and prevented the alteration of adipocyte insulin signaling. Further, when Tpl2 was inhibited in LPS-activated macrophages, the produced CM did not alter adipocyte insulin signaling and did not induce an inflammatory response in adipocytes. By contrast, Tpl2 silencing in adipocytes did not prevent the deleterious effects of a CM from LPS-activated macrophages. Together, these data establish that Tpl2, mainly in macrophages, is involved in the cross talk between adipocytes and macrophages that promotes inflammatory changes and alteration of insulin signaling in adipocytes. (*Endocrinology* 155: 951–964, 2014)

Obesity is associated with a chronic low-grade inflammation, and evidence has accumulated indicating that adipose tissue inflammation and dysfunction is involved in the development of insulin resistance (1, 2). Obese adipose tissue is infiltrated by immune cells, including macrophages that are attracted into the tissue by different chemokines, such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/chemokine (C-C motif) ligand 2 (3). Adipose tissue macrophages markedly contribute to the increase in inflammatory cytokines production, including

TNF- α , IL-1 β , and IL-6 (1, 2). The cytokines locally disrupt insulin action in adipocytes and also exacerbate systemic insulin resistance (1, 2). Furthermore, they increase lipolysis, and nonesterified fatty acids (NEFAs) exert pro-inflammatory effect on macrophages. As recently proposed, this paracrine loop between macrophages and adipocytes involving NEFAs and cytokines could sustain the inflammatory state of adipose tissue and contribute to insulin resistance (4, 5). Obesity is also associated with a change in gut microbiota, leading to a moderate increase

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170

Printed in U.S.A.

Copyright © 2014 by the Endocrine Society

Received September 2, 2013. Accepted December 31, 2013.

First Published Online January 7, 2014

Abbreviations: BMDM, bone marrow-derived macrophage; CD, cluster of differentiation; CM, conditioned medium; Ctrl siRNA, control siRNA; DMSO, dimethyl sulfoxide; Hsp90, heat shock protein 90; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IRS, insulin receptor substrate; LPS, lipopolysaccharide; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; NEFA, nonesterified fatty acid; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PKB, protein kinase B; siRNA, small interfering RNA; SOCS3, suppressors of cytokine signaling 3; TLR, Toll-like receptor; Tpl2, tumor progression locus 2.

in circulating lipopolysaccharides (LPSs) (6, 7). LPS, by interacting with Toll-like receptor (TLR)4, could also be involved in the communication between macrophages and adipocytes, leading to inflammatory changes in the adipose tissue and insulin resistance (8, 9). It is therefore important to identify the signaling pathways whereby macrophages and adipocytes communicate within the adipose tissue in order to develop new strategy to reduce obesity-associated inflammation and insulin resistance.

The serine/threonine kinase tumor progression locus 2 (Tpl2) (also known as Cot, Cancer Osaka thyroid) is a mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP3K8) activated by inflammatory stimuli, such as TNF- α , IL-1 β , and LPS. This kinase plays an important role in the regulation of the inflammatory response, and its deregulation is associated with inflammatory diseases and also with the progression of some cancers (10). Tpl2 is the sole MAP3K involved in the activation of Erk1/2 pathway in response to the stimulation of the TLR/IL-1 and TNF receptor family in macrophages, and Tpl2 also activates c-Jun N-terminal kinases in fibroblast or pancreatic cells (10, 11). Tpl2 signaling plays a critical role in immune cells for the production of cytokines, and Tpl2-deficient mice are protected against endotoxin shock owing to the inability of their macrophages to produce TNF- α (11). Further, Tpl2 positively controls IL-1 β production after infection by *Listeria monocytogenes* and after zymosan-induced peritonitis or in LPS-activated Kupffer cells (12–14). A positive role of Tpl2 in LPS-induced chemokine expression, including MCP-1, has also been reported (15).

One can speculate that Tpl2 could be involved in insulin resistance, because it governs the production of different cytokines and chemokines as well as the activation of different signaling pathways, such as ERK and c-Jun N-terminal kinases, involved in this pathological state (16–18). Accordingly, we have recently found an up-regulation of Tpl2 in adipose tissue of obese mice and patients (19). Furthermore, Tpl2 is activated by inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β , in adipocytes and induces lipolysis and insulin receptor substrate 1 (IRS1) serine phosphorylation through ERK activation (19). However, the implication of Tpl2 in inflammation and insulin resistance associated with obesity remains unclear, because the studies of obese Tpl2-deficient mice have led to contradictory results (20, 21). Moreover, whether Tpl2 signaling can be involved in the cross talk between adipocytes and macrophages has not been addressed. Coculture between adipocytes and macrophages provides experimental model to investigate the functional interaction between these 2 cell types in adipose tissue and to identify signaling pathways involved in their cross talk (4, 5, 22). Using such experimental approach, we show that Tpl2 signaling plays a critical role in the establishment of an inflammatory

paracrine loop between adipocytes and macrophages, leading to adipocyte insulin resistance. The data of this study also suggest that Tpl2 signaling in macrophages participates in LPS-induced adipose tissue inflammation and adipocyte insulin resistance in obesity.

Materials and Methods

Reagents and antibodies

DMEM, fetal bovine serum antibiotics, and Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent were purchased from Invitrogen (Life Technologies SAS). Insulin was from Lilly. Protease inhibitors cocktails were obtained from Roche Diagnostics. The Tpl2 kinase inhibitor (4-(3-chloro-4-fluorophenylamino)-6-(pyridine-3-yl-methylamino)-3-cyano-[1,7]-naphthyridine) (23, 24) was obtained from Calbiochem. Small interfering RNA (siRNA) against Tpl2 were purchased from Dharmacon (Thermo Fisher Scientific, Inc). Polyvinylidene difluoride membranes were purchased from Millipore. Bicinchoninic acid reagent was obtained from Pierce Biotechnology. Enhanced chemiluminescence reagent was purchased from PerkinElmer Life Sciences. LPS from *Escherichia coli* 0111:B4 strain and all other chemical reagents were purchased from Sigma.

Antibodies against Tpl2 and heat shock protein 90 (Hsp90) were from Santa Cruz Biotechnology, Inc; IRS1 antibody was from BD Bioscience. pSer (473)-protein kinase B (PKB), anti-PKB, phospho-ERK, ERK, and pSer (632)-IRS1 antibodies were from Cell Signaling Technology. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch.

Culture of 3T3-L1 adipocytes and RAW264.7 macrophages

3T3-L1 preadipocytes were differentiated into adipocytes as previously described and used 10 days after the induction of the differentiation (25). RAW264.7 macrophages (thereafter referred as RAW macrophages) were maintained in DMEM containing 5% (vol/vol) heat-inactivated fetal bovine serum and antibiotics at 37°C and 5% CO₂/95% air atmosphere.

Preparation of primary bone marrow-derived macrophages (BMDMs)

Bone marrow cells were isolated from tibia and femur of male C57BL/6J mice (Charles River Laboratories) as described (26). Mice were killed by cervical dislocation, and the medullar cavity of bone was flushed with DMEM containing 30% of L-929 conditioned medium (CM), 20% low endotoxin fetal bovine serum, and streptomycin/penicillin/Fungizone (BMDM medium). Cells were seeded in 100-mm petri dishes and differentiated into BMDMs in BMDM medium. The cells were ready to use around day 7 when the plates were semiconfluent.

Principles of laboratory animal care (NIH publication no. 85-23, revised 1985; <http://grants1.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm>) were followed, as well as those of the European Union guidelines on animal laboratory care. All procedures were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Medicine of the Nice Sophia Antipolis University.

Coculture of 3T3-L1 adipocytes and macrophages

Contact coculture was performed as previously described (4) with some slight modifications. RAW macrophages (4×10^5 cells) were seeded onto 12-well plates containing 3T3-L1 adipocytes (6×10^5 cells), and after 6 hours, the medium was changed for fresh medium with vehicle (dimethyl sulfoxide, DMSO) or with the Tpl2 inhibitor ($5 \mu\text{M}$). The medium was collected 24 hours later for the measurement of cytokine secretion, and cells were lysed for mRNA preparation. For the study of insulin signaling, cells were incubated without or with 1 nM insulin for 7 minutes and then lysed. As control, the same number of adipocytes and macrophages were cultured separately, treated exactly with the same conditions, and mixed after harvest (4).

Tpl2 knockdown was performed in RAW macrophages (2×10^5 /well of a 12-well plate) or 3T3-L1 adipocytes (8×10^5 cells/well of a 12-well plate) or both by using Tpl2 siRNA (50 nM) and Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent after the reverse transfection protocol of the manufacturer. 3T3-L1 adipocytes (8×10^5 cells) were seeded onto siRNA-treated macrophages, or RAW macrophages (3×10^5 cells) were seeded onto siRNA-treated adipocytes 24 hours after transfection. When knockdown was performed in both cell types, siRNA-treated adipocytes were seeded onto siRNA-treated macrophages. The cells and the medium were harvested 24 hours later as described above. As control, cells were cultured separately and treated exactly with the same conditions and mixed after harvest.

For the coculture between BMDM and 3T3-L1 adipocytes, BMDM (4×10^5 cells) were seeded onto 12-well plates containing 3T3-L1 adipocytes (6×10^5 cells), and the coculture was performed as described above without or with the Tpl2 inhibitor ($5 \mu\text{M}$).

Adipocyte treatment with the CM from LPS-activated RAW264.7 macrophages

RAW macrophages (3×10^5 cells/well for a 6-well plate) were incubated in 2 mL/well of cultured medium containing LPS (0.5 ng/mL) with vehicle (DMSO) or with the Tpl2 inhibitor ($5 \mu\text{M}$). Alternatively, Tpl2 siRNA-treated RAW macrophages (2×10^5 cells/well of a 6-well plate) were treated with LPS as described above. After 24 hours, the CM was collected and transferred onto 3T3-L1 adipocytes (0.5 mL of CM/well of a 12-well plate). For control condition, cultured medium containing the same concentration of LPS and Tpl2 inhibitor was added onto the adipocytes. After 24 hours, the cells were washed and incubated in fresh culture medium with or without insulin (1 nM) for 7 minutes and were lysed for insulin signaling analysis or mRNA preparation.

Western blotting

Cells were lysed, and proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes as previously described (25). Membranes were incubated with the indicated antibody, horseradish peroxidase-coupled antispecies antibodies were then added, and chemiluminescence was detected using Fujifilm Las-3000 apparatus (Fujifilm Life Science, FSVT). Quantifications were realized using MultiGauge software (Fujifilm Life Science).

Real-time RT-PCR

Real-time quantitative PCR was performed with sequence detection systems (ABI PRISM 7500; Applied Biosystems) and SYBR

green dye as described (25). Levels of mRNA were expressed relative to mouse *Rplp0*. The relative amount of mRNA between 2 groups was determined by using the second derivative maximum method. Primers used were from SABiosciences (QIAGEN).

Measurement of cytokine secretion and lipolysis

Cytokines secretion was measured by an ELISA (Invitrogen, Life Technologies SAS or eBioscience SAS) or multiplex assay (Millipore) following the manufacturer's protocol. Glycerol content of the incubation medium was determined as an index of lipolysis using a colorimetric assay (GPO-Trinder; Sigma).

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using GraphPad PRISM 5 software. Differences between groups were tested for significance by ANOVA with post hoc analysis. $P < .05$ was considered to be statistically significant.

Results

Implication of Tpl2 in the production of inflammatory cytokines and lipolysis induced by the coculture between adipocytes and macrophages

We first used a pharmacological inhibitor to investigate the contribution of Tpl2 in the inflammatory effect induced by the contact coculture between 3T3-L1 adipocytes and RAW macrophages. Concordant with previous published data (4, 5), the coculture markedly induced the secretion and gene expression of different inflammatory mediators [IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)] compared with cells cultured separately (Figure 1, A and B). Importantly, the Tpl2 inhibition prevented the coculture-induced secretion of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 entirely and markedly reduced the secretion of MCP-1 and PAI-1 (Figure 1A). These effects were associated with a reduction in the mRNA levels of IL-1 β , MCP-1, and PAI-1. By contrast, the reduced secretion of TNF- α and IL-6 occurred without any modification in their mRNA level (Figure 1B). Furthermore, Tpl2 inhibition also suppressed the coculture-induced glycerol release, indicating that lipolysis was severely blunted (Figure 1A). The inhibition of Tpl2 did not modify the expression of the macrophage marker *Emr1* (also known as *F4/80*) in cells cultured separately or even increased its expression in the coculture (Figure 1B). This indicates that the observed effect could not be explained by a reduction in macrophage number.

We then studied whether adipocytes and macrophages coculture could trigger M1 polarizing (proinflammatory) of the macrophages and the effect of Tpl2 on this process. We found that the coculture increased the expression of

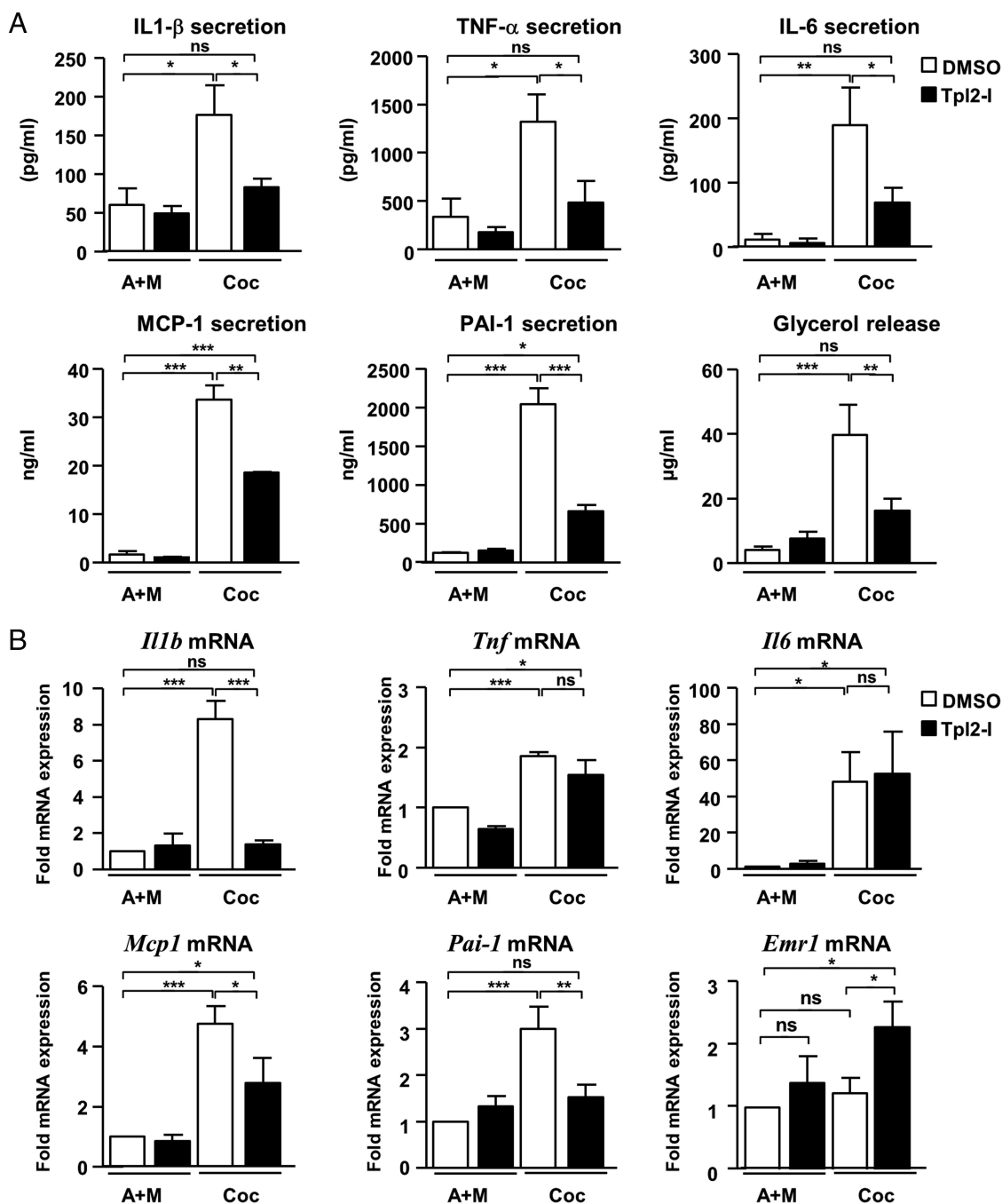


Figure 1. Pharmacological inhibition of Tpl2 in the coculture decreases the induction of inflammatory mediators and lipolysis. 3T3-L1 adipocytes and RAW264.7 macrophages were cultured separately (A+M) or cocultured in a contact system (Coc) for 24 hours with vehicle (DMSO) or with a pharmacological inhibitor of Tpl2 (Tpl2-I, 5 μ M). A, Secretion of the indicated cytokines and chemokines and glycerol release as an index of lipolysis in the medium. TNF- α and IL-6 secretion were measured by ELISA or Multiplex assay, IL-1 β by ELISA, and MCP-1 and PAI-1 by multiplex assay. B, Relative amount of the cytokines and chemokines mRNA determined by real-time PCR. The mRNA expression was normalized using mouse *Rplp0* mRNA level and expressed in arbitrary units with the control value (A+M treated with vehicle) taken as 1. Data are presented as means \pm SEM of 5–6 independent experiments. *, $P < .05$; **, $P < .01$; ***, $P < .001$; ns, not significant.

mRNAs coding for described M1 markers [cluster of differentiation (CD) 11c, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and CD127], whereas the expression of some (Arg1 and CD163) but not all (CD206) tested M2 markers was decreased. Tpl2 inhibition in the coculture strongly prevented the increase in M1 marker expression but did not prevent the decrease in M2 marker expression (Figure 2).

We also explored whether Tpl2 was involved in the cross talk between primary BMDMs and 3T3-L1 adipocytes using the coculture system. We found that the coculture increased the mRNA expression of IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, and PAI-1 (Figure 3). The pharmacological inhibition of Tpl2 suppressed the induction of *Il1b* and *Pai-1* mRNAs and markedly reduced *Mcp1*

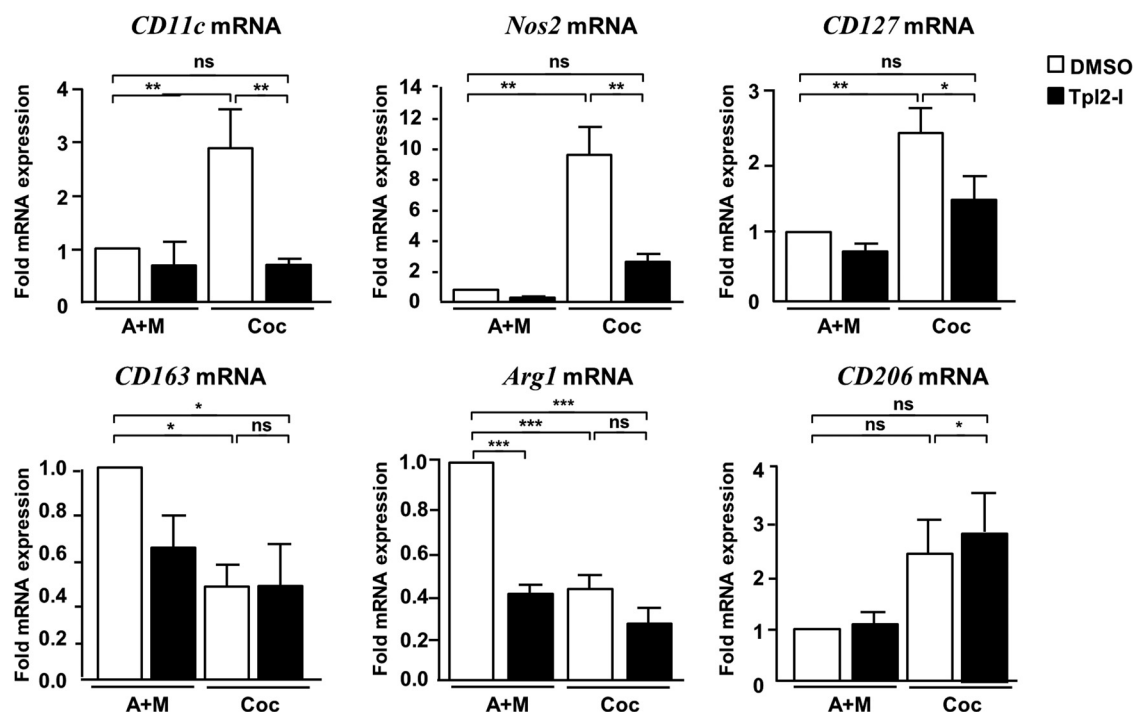


Figure 2. Effect of the pharmacological inhibition of Tpl2 on the expression of M1 and M2 macrophage markers. 3T3-L1 adipocytes and RAW264.7 macrophages were cultured separately (A+M) or cocultured in a contact system (Coc) for 24 hours with vehicle (DMSO) or with a pharmacological inhibitor of Tpl2 (Tpl2-I, 5 μ M). The relative amount of mRNAs for different M1 markers (CD11c, iNOS/NOS2, CD127) or M2 markers (Arg1, CD206, and CD163) was determined by real-time PCR. The mRNA expression was normalized using mouse *Rplp0* mRNA level and expressed in arbitrary units with the control value (A+M treated with vehicle) taken as 1. Data are presented as means \pm SEM of 3 independent experiments. *, $P < .05$; **, $P < .01$; ***, $P < .001$; ns, not significant.

mRNA level, whereas *Tnf*, *Il6*, and *Emr1* mRNA levels were not statistically modified (Figure 3).

Contribution of Tpl2 in adipocytes and macrophages to the induction of coculture-induced inflammatory mediators

We then investigated the relative contribution of Tpl2 in macrophages and in adipocytes to the coculture-induced cytokine expression or secretion. To this aim, coculture was performed either with Tpl2 siRNA-treated macrophages or either with Tpl2 siRNA-treated 3T3-L1 adipocytes. As control, coculture was performed either with macrophages or 3T3-L1 adipocytes treated with a control siRNA (Ctrl siRNA). Transfection of siRNA against Tpl2 achieved 60% efficiency in reducing the level of the long and small Tpl2 isoforms in both RAW macrophages and 3T3-L1 adipocytes (Figure 4, A and B). Tpl2 knockdown in macrophages entirely prevented the coculture-induced TNF- α secretion, whereas Tpl2 knockdown in adipocytes only modestly decreased it (Figure 4, C and D). These changes in TNF- α secretion occurred without any modification in *Tnf* mRNA expression (Figure 5, A and B). Knockdown of Tpl2 in cocultured macrophages reduced by 50% both MCP-1 secretion and mRNA expression (Figures 4C and 5A), whereas Tpl2 knockdown

in adipocytes did not significantly alter MCP-1 secretion and modestly reduced its mRNA level (Figures 4D and 5B). By contrast, IL-6 secretion in the coculture was reduced to the same level (~50%) after Tpl2 silencing in macrophages or adipocytes (Figure 4, C and D), even if the reduction in *Il6* mRNA level was more pronounced when Tpl2 was down-regulated in RAW macrophages compared with adipocytes (Figure 5, A and B). Tpl2 silencing in cocultured macrophages also reduced, by 45%–55%, the induction of *Il1b* and *Pai-1* mRNA levels, whereas Tpl2 silencing in cocultured adipocytes did not significantly alter their mRNA levels (Figure 5, A and B). Glycerol release in the medium was reduced to nearly the same level (30%–40%) with the knockdown of Tpl2 in macrophages or adipocytes (Figure 4, C and D). The observed effects in the coculture condition were not due to a reduction in macrophage number induced by the siRNA treatment, because *Emr1* mRNA level was not modified or even slightly increased (Figure 5, A and B). Further, we found that knockdown of Tpl2 in cocultured macrophages only or both in cocultured macrophages and adipocytes led to approximately the same decrease in cytokine mRNA expression (compared adipocytes treated with control siRNA/macrophages treated with Tpl2 siRNA with adipocytes treated with Tpl2 siRNA/macro-

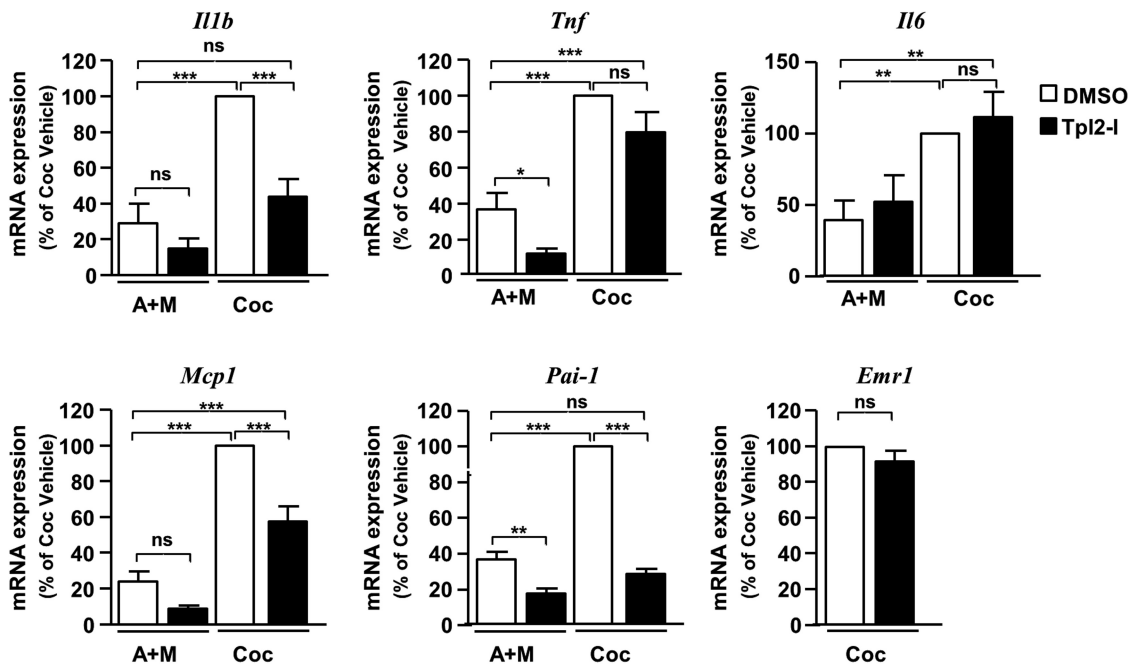


Figure 3. Pharmacological inhibition of Tpl2 in a coculture between BMDMs and 3T3-L1 adipocytes decreases the induction of inflammatory genes. Differentiated 3T3-L1 adipocytes and BMDMs were cultured separately (A+M) or cocultured in a contact system (Coc) for 24 hours with vehicle (DMSO) or a pharmacological inhibitor of Tpl2 (Tpl2-I, 5 μ M). The relative amount of the indicated cytokines and chemokines mRNA was determined by real-time PCR. The mRNA expression was normalized using mouse *Rplp0* mRNA level and expressed in arbitrary units with the value Coc treated with vehicle taken as 100. Data are presented as means \pm SEM of 5–6 independent experiments. *, $P < .05$; **, $P < .01$; ***, $P < .001$; ns, not significant.

phages treated with Tpl2 siRNA, Supplemental Figure 1A, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>.

Altogether, these data indicate that Tpl2 inhibition in macrophages is mainly involved in the decrease in cytokine expression and/or secretion. It is unlikely that the observed effect was due to a higher level of functional Tpl2 inhibition in macrophages compared with adipocytes. Indeed, the knockdown of Tpl2 decreased ERK activation, a kinase downstream the Tpl2 cascade, in response to different inflammatory stimuli by approximately 50% and 70% in macrophages and adipocytes, respectively (Supplemental Figure 1B).

The pharmacological inhibition of Tpl2 prevents the desensitization of insulin signaling induced by the coculture between adipocytes and macrophages

Because Tpl2 inhibition markedly reduced the expression of different cytokines, known to interfere with insulin signaling (1, 27), we explored the consequences on the desensitization of insulin signaling. As expected, insulin induced Ser⁴⁷³ phosphorylation of PKB when 3T3-L1 adipocytes were cultured separately from RAW macrophages. In coculture condition, the insulin effect on PKB phosphorylation was reduced by 35% without any modification in the total PKB amount (Figure 6A). Importantly,

the insulin effect on PKB phosphorylation was restored when the coculture was performed in the presence of the pharmacological inhibitor of Tpl2 (Figure 6A). The observed PKB phosphorylation in the coculture reflected mainly PKB activation by insulin in adipocytes, because we were unable to observe an effect of insulin in RAW macrophages (data not shown). Also, adipocytes predominantly contribute to the total protein amount in the lysates from the coculture system.

Obesity is associated with a moderate elevation of circulating LPS, and this so-called metabolic endotoxemia can participate in macrophage activation and insulin resistance (8, 9). We thus sought to determine the effect of Tpl2 inhibition on insulin signaling when RAW macrophages and 3T3-L1 adipocytes were cultured together in the presence of a concentration of LPS (0.5 ng/mL) within the dose range found in plasma of obese mice (8). Even in this condition, the pharmacological inhibition of Tpl2 in the coculture was able to prevent the inhibition of the insulin-induced PKB phosphorylation (Figure 6B).

Tpl2 knockdown in macrophages but not in adipocytes reduces the desensitization of insulin signaling in the coculture

We next determined the relative contribution of Tpl2 in macrophages and adipocytes for the desensitization of insulin signaling. To this aim, coculture was performed ei-

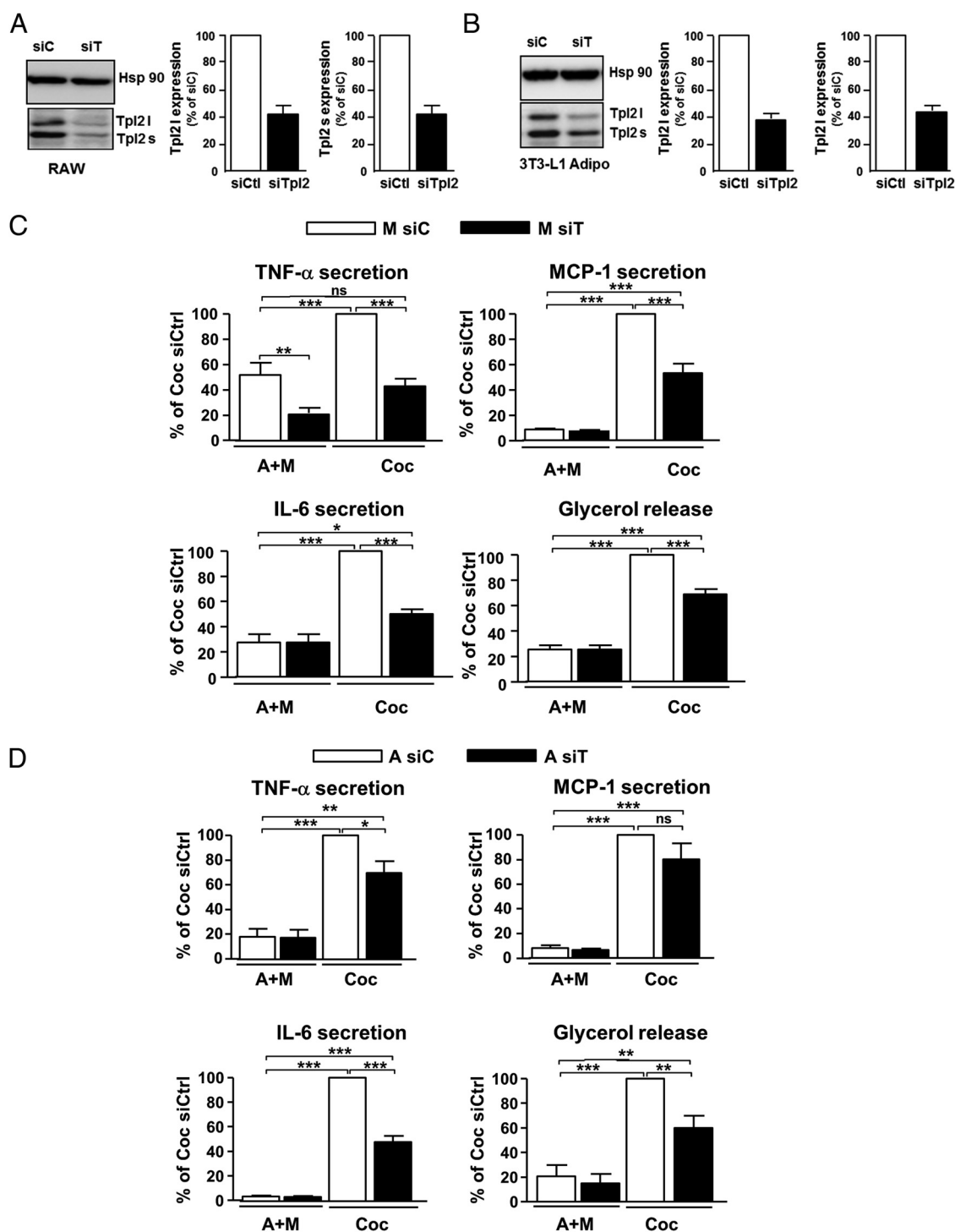


Figure 4. Effect of Tpl2 silencing in macrophages or adipocytes on cytokine secretion and lipolysis induced by the coculture. Representative Western blot analysis and quantification of Tpl2 expression in RAW macrophages (A) or 3T3-L1 adipocytes (B) treated with a Ctrl siRNA (siC) or with a Tpl2 siRNA (siT). C, RAW264.7 macrophages treated with a siCtrl (M siC) or with a siTpl2 (M siT) were cocultured with 3T3-L1 adipocytes either separately (A+M) or together (Coc) for 24 hours. D, 3T3-L1 adipocytes treated with a siCtrl (A siC) or with a siTpl2 (A siT) were cocultured with RAW macrophages either separately (A+M) or together (Coc) for 24 hours. Secretion of the indicated cytokines measured by ELISA and glycerol release in the medium were presented. Data are expressed as a percentage of secretion in coculture condition with siCtrl-treated cells and presented as means \pm SEM of 6–7 independent experiments. *, $P < .05$; **, $P < .01$; ***, $P < .001$; ns, not significant.

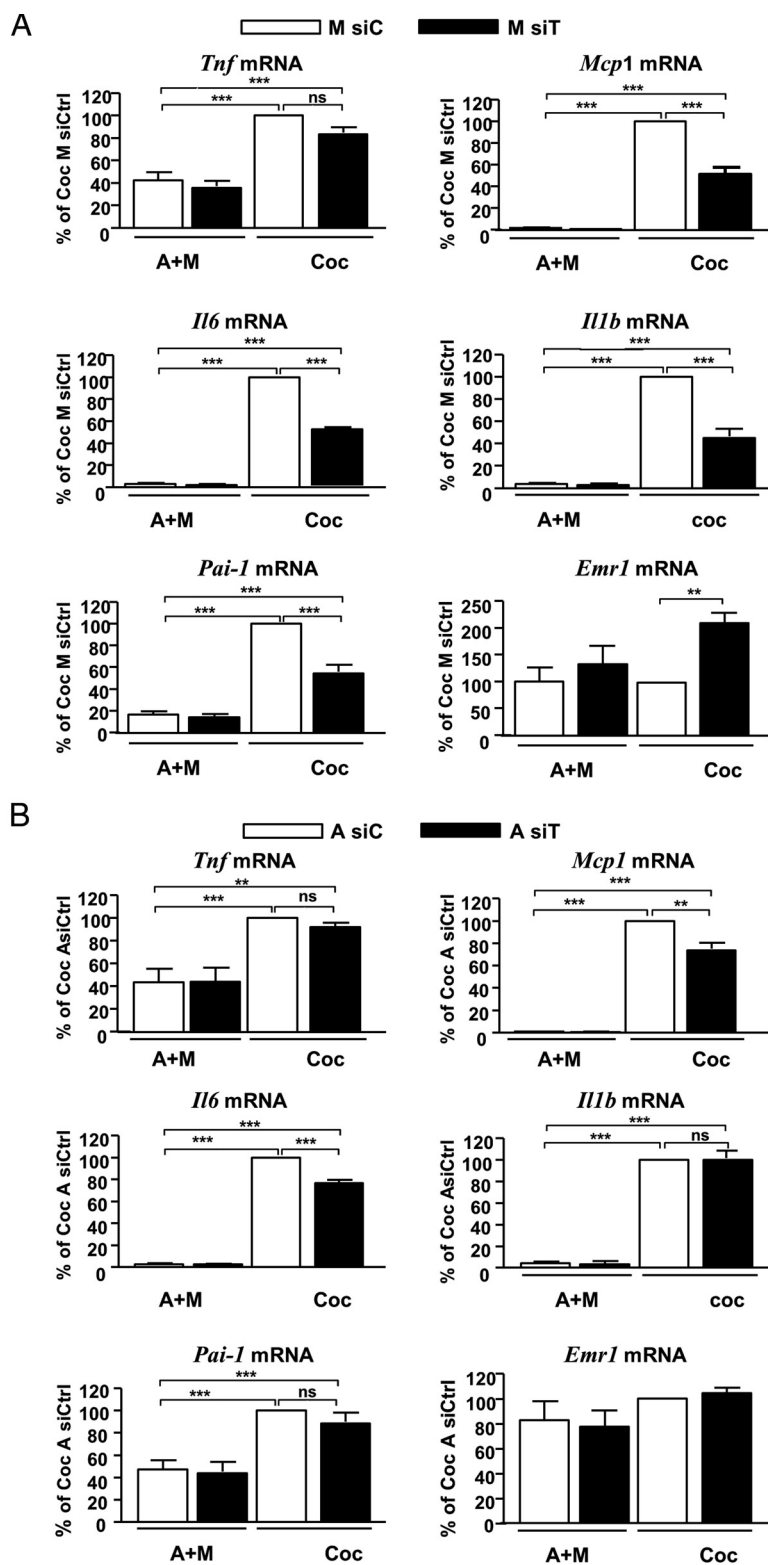


Figure 5. Effect of Tpl2 silencing in macrophages or in adipocytes on cytokine mRNA expression induced by the coculture. A, RAW264.7 macrophages treated with a Ctrl siRNA (M siC) or with a Tpl2 siRNA (M siT) were cultured with 3T3-L1 adipocytes either separately (A+M) or together (Coc) for 24 hours. B, 3T3-L1 adipocytes treated with a Ctrl siRNA (A siC) or with a Tpl2 siRNA (A siT) were cultured with RAW macrophages either separately (A+M) or together (Coc) for 24 hours. The relative amount of cytokine and chemokine mRNAs was determined by real-time PCR and normalized using mouse *Rplp0* mRNA level. Data are expressed as a percentage of mRNA in cells cocultured with siCtrl-treated macrophages (A) or adipocytes (B) and presented as means \pm SEM of 6–7 independent experiments. **, $P < .01$; ***, $P < .001$; ns, not significant.

ther with Tpl2 siRNA-treated macrophages (Figure 6, C and D) or either with Tpl2 siRNA-treated 3T3-L1 adipocytes (Figure 6, E and F). As control, coculture was performed either with macrophages or 3T3-L1 adipocytes treated with a Ctrl siRNA. The amount of IRS1 (Figure 6, C and E) and its tyrosine phosphorylation (data not shown) as well as the insulin effect on PKB phosphorylation (Figure 6, D and F) were decreased by nearly 50% when the coculture was performed with macrophages or adipocytes treated with Ctrl siRNA. Importantly, the decrease in IRS1 amount and in insulin-induced PKB phosphorylation was totally prevented when Tpl2 was down-regulated in cocultured macrophages (Figure 6, C and D). By contrast, the down-regulation of Tpl2 in adipocytes was not able to prevent the desensitization of insulin signaling induced by cocultured macrophages (Figure 6, E and F). These observations indicate that Tpl2 activation in macrophages by promoting the secretion of inflammatory mediators plays a critical role in the coculture-induced desensitization of insulin signaling in adipocytes.

Tpl2 inhibition prevents the effects of CM derived from LPS-activated macrophages on 3T3-L1 adipocytes

LPS derived from gut microbiota is another important inflammatory signal involved in adipose tissue inflammation and adipocyte insulin resistance through activation of adipose tissue macrophages (8, 9). Using CM from LPS-treated RAW macrophages, we first investigated the role of Tpl2 in macrophages for LPS-induced adipocytes insulin resistance. When 3T3-L1 adipocytes were exposed to CM from LPS-treated macrophages, both the amount of IRS1 and the level of insulin-induced PKB phosphorylation

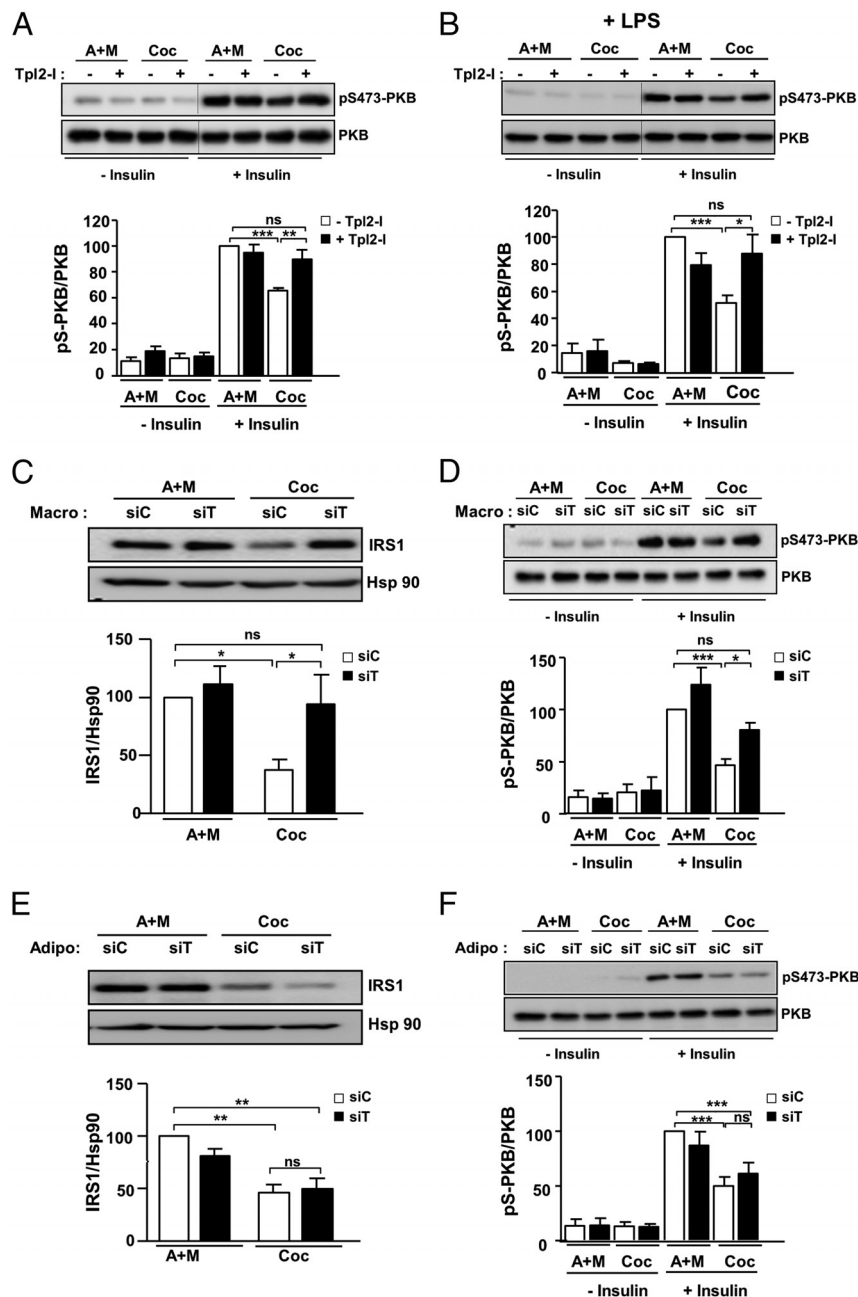


Figure 6. The pharmacological inhibition of Tpl2 or its silencing in macrophages prevents the desensitization of insulin signaling induced by the coculture. A, 3T3-L1 adipocytes and RAW macrophages were cultured separately (A+M) or cocultured (Coc) for 24 hours without or with a Tpl2 inhibitor (Tpl2-I, 5 μM). B, 3T3-L1 adipocytes and RAW macrophages were cultured separately (A+M) or cocultured (Coc) as above but in the presence of LPS (0.5 ng/mL). C and D, RAW macrophages treated with a Ctrl siRNA (siC) or a Tpl2 siRNA (siT) were cocultured with adipocytes (Coc) or the cells were cultured separately (A+M) for 24 hours. E and F, 3T3-L1 adipocytes treated with a Ctrl siRNA (siC) or a Tpl2 siRNA (siT) were cocultured with RAW macrophages (Coc) or the cells were cultured separately (A+M) for 24 hours. For each condition, cells were incubated without or with insulin (1 nM) for 7 minutes and were lysed for Western blot analysis of IRS1 with Hsp90 as loading control (C and E), pSer473-PKB and total PKB (A, B, D, and F). Representative immunoblots and means \pm SEM of 5–6 independent experiments are shown. Conditions were normalized to cells cultured separately (A+M) and treated with vehicle and insulin (A and B) or to cells cultured separately with siCtrl-treated macrophages or siCtrl-treated adipocytes (C–F, respectively). *, $P < .05$; **, $P < .01$; ***, $P < .001$; ns, not significant.

were reduced by 40% compared with adipocytes treated with control medium (Figure 7, A and B), whereas the expression of suppressors of cytokine signaling 3 (SOCS3) (Figure 8A), an inhibitor of insulin signaling (28), as well as the pSer632 IRS1 to IRS1 ratio, was increased (Supplemental Figure 2A). These modifications in insulin signaling were partially prevented when adipocytes were exposed to CM collected from LPS-activated macrophages treated with the Tpl2 inhibitor (Figures 7A and 8A and Supplemental Figure 2A) or to CM collected from LPS-activated macrophages, in which Tpl2 was knocked-down (Figures 7B and 8B). By contrast, the silencing of Tpl2 in adipocytes was not able to prevent the effect of the CM from LPS-treated macrophages on IRS1 amount and insulin-induced PKB phosphorylation (Figure 7C) or on SOCS3 expression (Figure 8C).

In addition to macrophages, adipocytes can also up-regulate the expression of some cytokines, including IL-6, MCP-1, and PAI-1, under inflammatory conditions. We next sought to determine whether the blockade of Tpl2 in macrophages could alter the adipocyte expression of these cytokines induced by the inflammatory CM. Inhibition of Tpl2 in LPS-treated macrophages by using a pharmacological inhibitor or a siRNA reduced the ability of the CM to increase *Il6*, *Mcp1*, and *Pai-1* mRNA levels in adipocytes (Figure 8, A and B). By contrast, the silencing of Tpl2 in adipocytes did not prevent or only slightly attenuated the increase of the mRNA levels of these cytokines induced by the CM (Figure 8C).

We also investigated the effect of a CM from untreated macrophages. The increased expression of *Il6*, *Mcp1*, *Pai-1*, and *Socs3* mRNAs in adipocytes was markedly lower compared with medium from LPS-treated macrophages (Supplemental

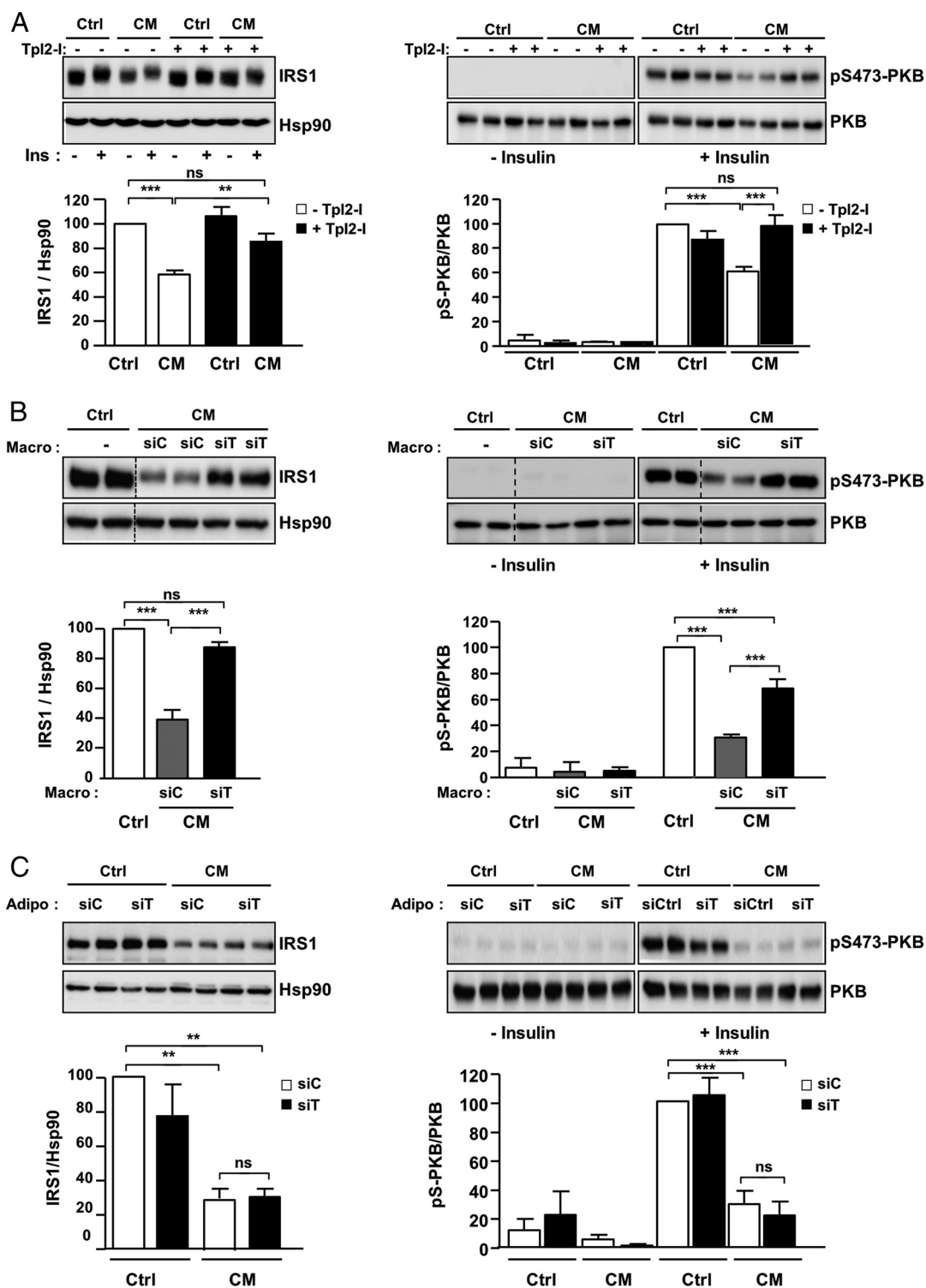


Figure 7. The pharmacological inhibition of Tpl2 or its silencing in macrophages prevents the desensitization of insulin signaling induced by CM from LPS-activated macrophages. **A**, 3T3-L1 adipocytes were incubated for 24 hours with CM from RAW macrophages treated with LPS (0.5 ng/mL) without or with a Tpl2 inhibitor (Tpl2-I, 5 μ M) or with cultured medium containing the same concentration of LPS and/or Tpl2 inhibitor (control medium, Ctrl). Thereafter, cells were incubated without or with insulin (1 nM) for 7 minutes and were lysed for IRS1, pSer473-PKB and total PKB analysis by Western blotting. **B**, 3T3-L1 adipocytes were incubated for 24 hours with CM harvested from LPS-stimulated RAW macrophages treated with Ctrl siRNA (siC) or Tpl2 siRNA (siT) or adipocytes were incubated with cultured medium containing LPS (0.5 ng/mL) as control medium (Ctrl). Cells were stimulated with insulin and blots performed as in **A**. **C**, 3T3-L1 adipocytes treated with Ctrl siRNA (siC) or Tpl2 siRNA (siT) were incubated with CM from LPS-stimulated RAW macrophages or adipocytes were incubated with cultured medium containing LPS (0.5 ng/mL) as control medium (Ctrl). Cells were stimulated with insulin and blots performed as in **A**. Representative immunoblots and means \pm SEM of 4–5 independent experiments are shown. Data are expressed as a percentage of IRS1 to Hsp90 (loading control) or pSer473-PKB to total PKB ratio in cells treated with Ctrl medium or with Ctrl medium and insulin, respectively. *, $P < .05$; **, $P < .01$; ***, $P < .001$; ns, not significant.

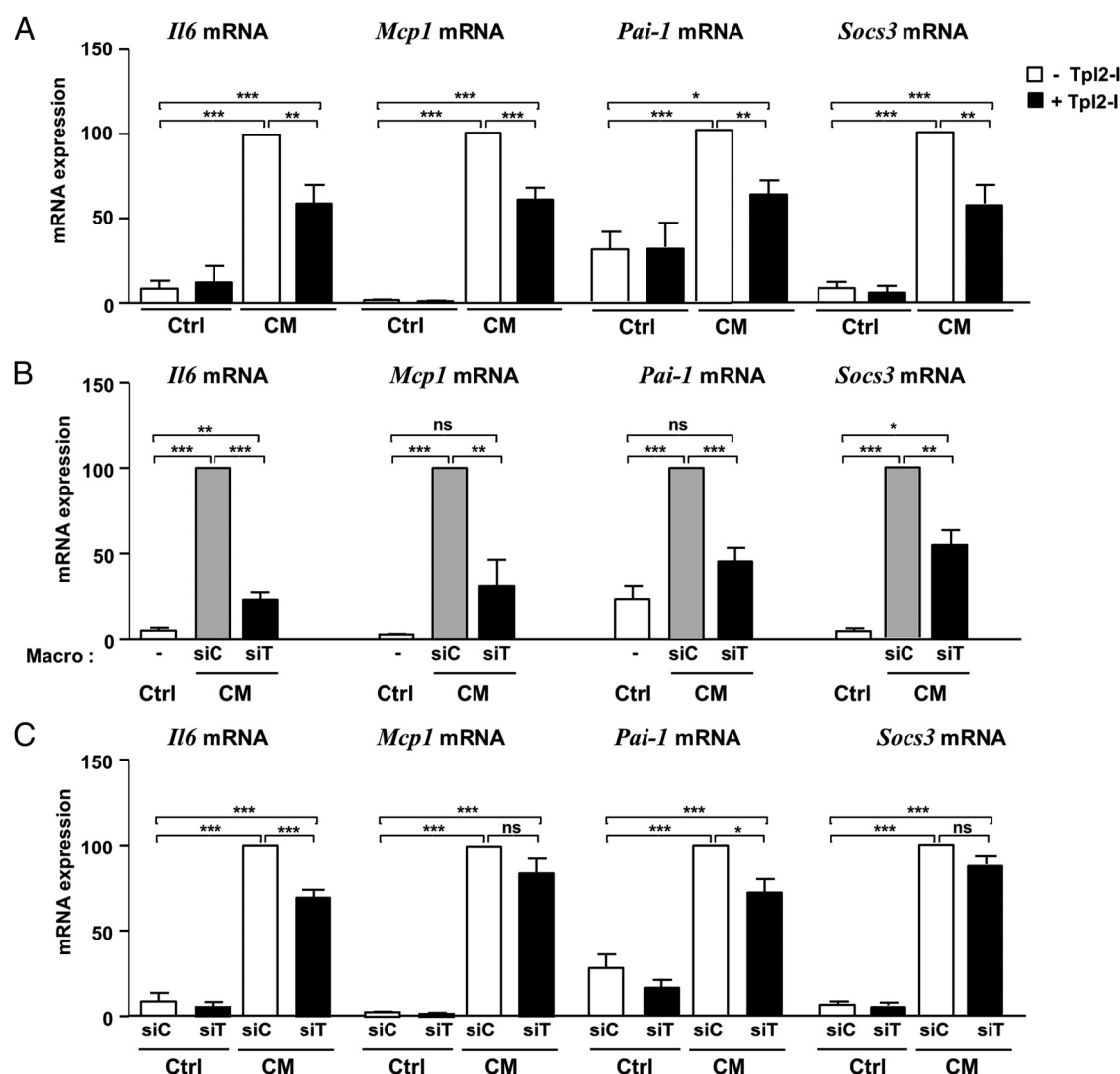


Figure 8. The pharmacological inhibition of Tpl2 or its silencing in macrophages reduces the inflammatory effect of a CM from LPS-activated macrophages on 3T3-L1 adipocytes. Relative amount of *Il6*, *Mcp1*, and *Pai-1* and *Socs3* mRNAs in adipocytes treated with control medium (Ctrl) or CM from RAW macrophages treated with LPS (0.5 ng/mL, 24 h) without or with a Tpl2 inhibitor (Tpl2-I, 5 μ M). B, Relative amount of *Il6*, *Mcp1*, and *Pai-1* mRNAs in adipocytes treated with control medium (Ctrl) or CM from RAW macrophages treated with a Ctrl siRNA (siC) or a Tpl2 siRNA (siT) and incubated with LPS. C, Relative amount of *Il6*, *Mcp1*, and *Pai-1* mRNAs in 3T3-L1 adipocytes treated with a Ctrl siRNA (siC) or a Tpl2 siRNA (siT) and incubated for 24 hours with control medium (Ctrl) or CM from RAW macrophages treated with LPS. Data are expressed as a percentage of mRNA expression in adipocytes treated with CM from macrophages incubated without Tpl2 inhibitor (A) or with CM from siC-treated macrophages (B) or as a percentage of mRNA expression in siC-treated adipocytes treated with CM (C). Means \pm SEM of 4–6 independent experiments are presented. *, $P < .05$; **, $P < .01$; ***, $P < .001$; ns, not significant.

Figure 2B). Further, this medium did not decrease the insulin effect on PKB phosphorylation (Supplemental Figure 2C). Pharmacological inhibition of Tpl2 in macrophages prevented the low induction of *Mcp1* and *Pai-1* mRNAs and partially reduced the induction *Socs3* mRNA. By contrast, *Il6* mRNA induction was not modified by the inhibitor (Supplemental Figure 2B).

Discussion

A cross talk between macrophages and adipocytes plays a central role in the pathogenesis of obesity-associated chronic

inflammation and insulin resistance (1, 2, 4). Identification of inflammatory pathways that govern this cross talk may thus provide new insight into mechanisms involved in obesity-induced insulin resistance. The expression of the MAP3 kinase Tpl2 is up-regulated in adipose tissue of obese patients (19) both in adipocytes and in adipose tissue macrophages (our unpublished data). Further, in several inflammatory conditions, Tpl2 governs the expression of cytokines, such as TNF- α , IL-1 β , or IL-6 (11, 12, 14, 29), known to be involved in insulin resistance (25, 30). Here, we provide evidences that Tpl2 may contribute to adipocytes insulin resistance by initiating or sustaining a deleterious cross talk between adipocytes and macro-

phages, leading to the production of inflammatory cytokines by macrophages.

We showed that the pharmacological inhibition of Tpl2 in a coculture between 3T3-L1 adipocytes and RAW macrophages or BMDM totally prevented the secretion or expression of TNF- α and IL-1 β . This effect was largely dependent on a functional Tpl2 signaling pathway in macrophages. Accordingly, TNF- α is mostly derived from macrophages in the coculture system (4), and production of both TNF- α and IL-1 β is mostly due to macrophages in obese adipose tissue (1). Our data indicate that Tpl2 regulates *Il1b* mRNA expression in the cocultured macrophages. Tpl2 has been reported as an important signal transducer for the regulation of *Il1b* mRNA in macrophages or dendritic cells in response to LPS and TLR9 ligand or in response to infection with *L. monocytogenes* (10, 12). Our findings extend this role of Tpl2 to the regulation of *Il1b* mRNA induced by the cross talk between adipocytes and macrophages. In contrast to what we observed for IL-1 β , the inhibition of TNF- α secretion occurred without any change in the level of its mRNA, indicating that Tpl2 regulates posttranslational modifications of TNF- α necessary for its secretion. One important mechanism for TNF- α secretion is its processing by the TNF- α -converting enzyme TACE, a process that is positively controlled by the Tpl2/ERK pathway (31, 32). It is thus plausible that Tpl2 controls TNF- α secretion in the coculture through this mechanism.

The increased expression/secretion of TNF- α and IL-1 β could be due to a modification in the polarization of the macrophages induced by the cross talk with the adipocytes. Indeed, we found that the coculture increased the expression of different M1 markers (CD11c, iNOS, and CD127), whereas the expression of M2 markers (Arg1 and CD163) was decreased. This observation suggests that factors produced by the cross talk between adipocyte and macrophages in obese adipose tissue could skew the polarization of macrophages towards classically activated (M1) profile that are known to participate in insulin resistance through the secretion of proinflammatory cytokines (33). Interestingly, Tpl2 inhibition in the coculture partially prevented the increase in M1 marker expression but did not prevent the decrease in M2 marker expression. Tpl2 inhibition could have beneficial effect in adipose tissue inflammation associated with obesity by decreasing the M1 to M2 ratio mainly by affecting the M1 polarization.

In addition to TNF- α and IL-1 β , Tpl2 inhibition markedly decreased the secretion of other inflammatory mediators in the coculture, including IL-6, MCP-1, and PAI-1. The inhibition of Tpl2 in adipocytes or macrophages markedly impaired IL-6 production in the coculture, suggesting that Tpl2 activation in both cell types is necessary

for IL-6 secretion induced by the cross talk between adipocytes and macrophages. By contrast, the silencing of Tpl2 in macrophages decreased the secretion of MCP-1, whereas Tpl2 silencing in adipocytes had only a weak effect. In the context of the coculture, it was shown that the extent of MCP-1 up-regulation was larger in adipocytes compared with macrophages (5), and in obese adipose tissue, a cross talk between macrophages and adipocytes could sustain MCP-1 secretion (34–36). It is therefore likely that the decrease in MCP-1 secretion in the coculture was mainly the consequence of the reduced macrophage-derived cytokine production owing to Tpl2 inhibition. Our data also suggest that the same mechanism is responsible for the reduction in PAI-1 expression, because PAI-1 is mainly controlled by TNF- α in adipose tissue (37).

NEFAs are an important paracrine mediator of inflammation in obese adipose tissue and are involved in inflammatory changes in the coculture system (5, 26, 38, 39). Interestingly, we found that pharmacological inhibition of Tpl2, which decreased the production of inflammatory cytokines, reduced the lipolysis in the coculture and that Tpl2 pathway both in adipocytes and macrophages contributed to the coculture-induced NEFA release. It is conceivable that the decrease in cytokine production induced by Tpl2 silencing in macrophages may in turn reduce adipocyte lipolysis, whereas Tpl2 silencing in adipocytes directly reduces the lipolytic effect of the cytokines as we previously reported (19). However, the reduced lipolysis obtained after Tpl2 inhibition in adipocytes is not sufficient to markedly prevent inflammatory changes if Tpl2 is not blocked in macrophages. A major role of Tpl2 in macrophages for the production of inflammatory mediators is also supported by the approximately same decrease in cytokine mRNA expression after knockdown of Tpl2 in cocultured macrophages only or both in cocultured macrophages and adipocytes (Supplemental Figure 1A).

LPS derived from gut microbiota is another important contributor of adipose tissue inflammation and insulin resistance (8, 40). Similar to the effect in obesity, whereby cytokines, NEFAs, and LPSs are involved in the desensitization of insulin signaling (27), we found that insulin signaling was markedly repressed in the cocultured adipocytes as well as in adipocytes exposed to CM from LPS-treated macrophages. Both experimental conditions induced an inhibition in insulin-induced PKB phosphorylation. This effect is probably mainly due to the observed decrease in IRS1 amount and function. The alteration at the level of IRS1 could be mediated by a decrease in transcription induced by inflammatory cytokines, such as IL-1 β , as previously shown (16, 25) but also by posttranslational modifications. Indeed, the serine phosphorylation of IRS1 and the expression of SOCS3 were increased, and

both are involved in the alteration of IRS1 function by promoting its degradation and/or by reducing its tyrosine phosphorylation (16, 28).

The pharmacological inhibition of Tpl2 in the coculture or in LPS-treated macrophages prevented the desensitization of insulin signaling in adipocyte and also reduced the expression of SOCS3 and the increased IRS1 serine phosphorylation induced by CM from LPS-treated macrophages. These findings suggest an important role for Tpl2 in the cross talk between adipocytes and macrophages, leading to adipocyte insulin resistance. The data of the selective invalidation of Tpl2 in macrophages or in adipocytes support a model in which Tpl2 activation in macrophages governs the production of cytokines that alter adipocyte insulin signaling. By contrast, Tpl2 inhibition in adipocytes is not sufficient to prevent the desensitization of insulin signaling induced by the macrophage-derived cytokines. This is in contrast with our previous study showing that Tpl2 inhibition in adipocytes prevented ERK-mediated inhibitory serine phosphorylation of IRS1 induced by TNF- α or IL-1 β (19). Multiple signaling pathways, beside ERK pathway, are involved in the desensitization of insulin signaling induced by inflammatory cytokines (16, 18, 27, 28, 41, 42). In the present study, the production of several cytokines by the coculture or by LPS-activated macrophages may activate both Tpl2-dependent and Tpl2-independent pathways that synergistically act to down-regulate the insulin signaling. This could explain why Tpl2 inhibition in adipocytes was not sufficient to protect them against insulin resistance.

A discrepancy in the literature on the role of Tpl2 in obesity-induced insulin resistance has been reported (20, 21) with no obvious explanation. If, as suggested by our findings, Tpl2 in macrophages was mainly involved in the deleterious cross talk with adipocytes in obese adipose tissue, it might be possible that subtle differences in the population of immune cells in adipose tissue between the 2 studies explain this discrepancy. Indeed, complex interactions between immune cells and other factors, such as gut microbiota, drive the metabolic phenotype (9). In this regard, contradictory results about the metabolic phenotype of TLR2-deficient mice have been explained by some differences in the interactions between environment, gut microbiota, immune system, and the genetic of the host (43, 44). Concerning the Tpl2-deficient mice, it is thus possible that differences in mice gut microbiota between the 2 studies may have shaped an immune cell population, in which the protective effect of the genetic deficiency in Tpl2 could be operative or not.

In conclusion, our study provides evidences the Tpl2 pathway is involved in the formation of paracrine loop between adipocytes and macrophages that promotes in-

flammatory changes and the down-regulation of insulin signaling in adipocytes. Further, our data highlight a major role of Tpl2 in cocultured macrophages for the production of cytokines, whereas Tpl2 activation in adipocytes is involved in the release of NEFAs. Finally, our data provide evidences that the Tpl2 pathway in macrophages plays a critical role for LPS-induced adipocytes insulin resistance. Our study suggests that deregulation of Tpl2 expression, especially in adipose tissue macrophages, may be involved in the perturbed cross talk between adipocytes and macrophages in inflamed adipose tissue in obesity.

Acknowledgments

We thank Frédéric Bost, Yannick Le Marchand-Brustel, and Sophie Giorgetti-Péraldi [Inserm, Unit 1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M)] for critical reading of the manuscript and helpful discussions; Michele Trabucchi for helpful advices and assistance for BMDM isolation; and Véronique Corcelle and the animal facility staff [Inserm, Unit 1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M)] for animal care and breeding.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr Jean-François Tanti, Inserm, Unit 1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Bâtiment Archimède, 151 Route de St Antoine de Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice Cedex 3, France. Email: tanti@unice.fr.

Present address for J.J.: Division of Endocrinology, Diabetes, and Metabolism, Department of Medicine, Department of Genetics, and The Institute for Diabetes, Obesity, and Metabolism, Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania, PA 19104.

This work was supported by Inserm, the Université de Nice Sophia Antipolis, Agence National de la Recherche Grant 2010-BLAN-1117-01 (to J.-F.T.) and by LABEX SIGNALIFE Grant ANR-11-LABX-0028-01 and Alfediam-Abbott Grant (to J.-F.T.). F.C. is supported by an Inserm/Région Provence Alpes-Côte d'Azur doctoral fellowship and by a grant from the Société Francophone du Diabète.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:415–445.
- Sun S, Ji Y, Kersten S, Qi L. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annu Rev Nutr.* 2012;32:261–286.
- Panec J. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine.* 2012;60:1–12.
- Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of

- free fatty acids and tumor necrosis factor α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2062–2068.
5. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, et al. Role of the Toll-like receptor 4/NF- κ B pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:84–91.
 6. Teixeira TF, Collado MC, Ferreira CL, Bressan J, Peluzio Mdo C. Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. *Nutr Res.* 2012;32:637–647.
 7. Cani PD, Osto M, Geurts L, Everard A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes.* 2012;3:279–288.
 8. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007;56:1761–1772.
 9. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science.* 2012;336:1262–1267.
 10. Gantke T, Sriskantharajah S, Ley SC. Regulation and function of TPL-2, an I κ B kinase-regulated MAP kinase kinase kinase. *Cell Res.* 2011;21:131–145.
 11. Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, et al. TNF- α induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell.* 2000;103:1071–1083.
 12. Mielke LA, Elkins KL, Wei L, et al. Tumor progression locus 2 (Map3k8) is critical for host defense against *Listeria monocytogenes* and IL-1 β production. *J Immunol.* 2009;183:7984–7993.
 13. Soria-Castro I, Krzyzanowska A, Pelaéz ML, et al. Cot/tpl2 (MAP3K8) mediates myeloperoxidase activity and hypernociception following peripheral inflammation. *J Biol Chem.* 2010;285:33805–33815.
 14. Perugorria MJ, Murphy LB, Fullard N, et al. Tumor progression locus 2/Cot is required for activation of extracellular regulated kinase in liver injury and toll-like receptor-induced TIMP-1 gene transcription in hepatic stellate cells in mice. *Hepatology.* 2013;57:1238–1249.
 15. Bandow K, Kusuyama J, Shamoto M, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T. LPS-induced chemokine expression in both MyD88-dependent and -independent manners is regulated by Cot/Tpl2-ERK axis in macrophages. *FEBS Lett.* 2012;586:1540–1546.
 16. Tanti JF, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9:753–762.
 17. Jager J, Corcelle V, Grémeaux T, et al. Deficiency in the extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) protects leptin-deficient mice from insulin resistance without affecting obesity. *Diabetologia.* 2011;54:180–189.
 18. Solinas G, Karin M. JNK1 and IKK β : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *Faseb J.* 2010;24:2596–2611.
 19. Jager J, Grémeaux T, Gonzalez T, et al. The Tpl2 kinase is up-regulated in adipose tissue in obesity and may mediate IL-1 β and TNF- α effects on ERK activation and lipolysis. *Diabetes.* 2010;59:61–70.
 20. Lancaster GI, Kowalski GM, Estevez E, et al. A Tumor progression locus 2 (Tpl2) deficiency does not protect against obesity-induced metabolic disease. *PLoS One.* 2012;7:e31900.
 21. Perfield 2nd JW, Lee Y, Shulman GI, et al. Tumor progression locus 2 (TPL2) regulates obesity-associated inflammation and insulin resistance. *Diabetes.* 2011;60:1168–1176.
 22. Lumeng CN, Deyoung SM, Saltiel AR. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292:E166–E174.
 23. Hatzia Apostolou M, Polyarchou C, Panutopoulos D, Covic L, Tsi-chlis PN. Proteinase-activated receptor-1-triggered activation of tumor progression locus-2 promotes actin cytoskeleton reorganization and cell migration. *Cancer Res.* 2008;68:1851–1861.
 24. Gavrin LK, Green N, Hu Y, et al. Inhibition of Tpl2 kinase and TNF- α production with 1,7-naphthyridine-3-carbonitriles: synthesis and structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005;15:5288–5292.
 25. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology.* 2007;148:241–251.
 26. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem.* 2007;282:35279–35292.
 27. Tanti JF, Ceppo F, Jager J, Berthou F. Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:181.
 28. Lebrun P, Van Obberghen E. SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiol (Oxf).* 2008;192:29–36.
 29. López-Pelaéz M, Fumagalli S, Sanz C, et al. Cot/tpl2-MKK1/2-Erk1/2 controls mTORC1-mediated mRNA translation in Toll-like receptor-activated macrophages. *Mol Biol Cell.* 2012;23:2982–2992.
 30. Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27(suppl 3):S53–S55.
 31. Rousseau S, Papoutsopoulou M, Symons A, et al. TPL2-mediated activation of ERK1 and ERK2 regulates the processing of pre-TNF α in LPS-stimulated macrophages. *J Cell Sci.* 2008;121:149–154.
 32. Soond SM, Everson B, Riches DW, Murphy G. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF α -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci.* 2005;118:2371–2380.
 33. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:219–246.
 34. Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, et al. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem.* 2003;278:46654–46660.
 35. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112:1821–1830.
 36. Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:2282–2289.
 37. Bastelica D, Mavri A, Verdier M, Berthet B, Juhan-Vague I, Alessi MC. Relationships between fibrinolytic and inflammatory parameters in human adipose tissue: strong contribution of TNF α receptors to PAI-1 levels. *Thromb Haemost.* 2002;88:481–487.
 38. Shi H, Kokoeva M, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116:3015–3025.
 39. Iyer A, Fairlie DP, Prins JB, Hammock BD, Brown L. Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2010;6:71–82.
 40. Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des.* 2009;15:1546–1558.
 41. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, et al. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- α in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem.* 2001;276:47944–47949.
 42. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002;420:333–336.
 43. Caricilli AA, Picardi PK, de Abreu LL, et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS Biol.* 2011;9(12):e1001212.
 44. Caricilli AM, Nascimento PH, Pauli JR, et al. Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. *J Endocrinol.* 2008;199:399–406.

Supplemental Figure Legends

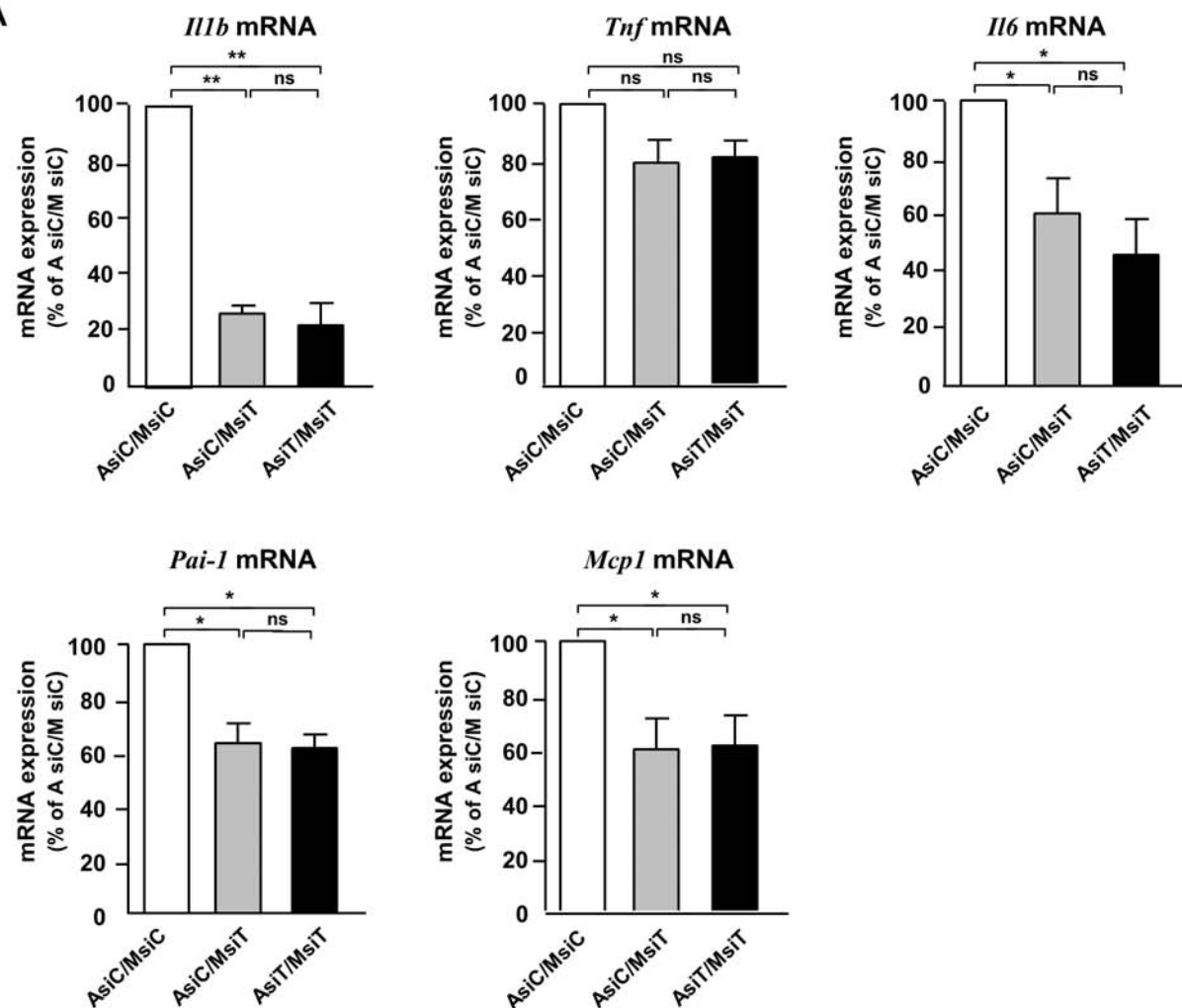
Supplemental Figure 1. A. Comparison of the relative amount of cytokine and chemokine mRNAs in co-culture between Ctrl siRNA-treated 3T3-L1 adipocytes and Ctrl siRNA-treated RAW macrophages (A siC/M siC, white bars) or in co-culture between Ctrl siRNA treated 3T3-L1 adipocytes and Tpl2 siRNA-treated RAW macrophages (A siC/M siT, grey bars) or in co-culture between Tpl2 siRNA-treated 3T3-L1 adipocytes and Tpl2 siRNA-treated RAW macrophages (A siT/M siT, black bars). The relative amount of mRNAs was determined by real-time PCR and normalized using mouse Rplp0 mRNA level. Data are expressed as a percentage of mRNA in cells co-cultured with both siCtrl-treated macrophages and adipocytes (A siC/M siC) and presented as means \pm SEM of 3 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns: not significant. B. RAW macrophages or 3T3-L1 adipocytes treated with Ctrl siRNA (siC) or Tpl2 siRNA (siT) were stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) or TNF- α (10 ng/ml) or LPS (10 ng/ml) for 20 min and were lysed for Western Blot analysis of phospho-ERK1/2 and total ERK1/2. Representative immunoblot and means \pm SEM of 3 experiments are shown. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by paired student's t test.

Supplemental Figure 2. A. 3T3-L1 adipocytes were incubated for 24 h with conditioned medium (CM) from RAW macrophages treated with LPS (0.5 ng/ml) without or with a Tpl2 inhibitor (Tpl2-I, 5 μ M) or with cultured medium containing the same concentration of LPS and/or Tpl2 inhibitor (control medium, Ctrl). Thereafter cells were lysed for analysis of pSer632-IRS1 and IRS1 by Western blot. Representative immunoblots and means \pm SEM of 3 independent experiments are shown. Data are expressed as a percentage of pSer632-IRS1 to total IRS1 ratio in cells treated with CM without Tpl2 inhibitor. B. Relative amount of *Il6*, *Mcp1*, *Pai-1* and *Socs3* mRNAs in adipocytes treated with control medium (Ctrl) or conditioned medium (CM) from RAW macrophages incubated without LPS and treated without or with a Tpl2 inhibitor (Tpl2-I, 5 μ M). Data are expressed as a percentage of mRNA expression in adipocytes treated with CM from macrophages incubated without Tpl2 inhibitor. Means \pm SEM of 3 independent experiments are presented. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant. C. 3T3-L1 adipocytes were incubated for 24h with control medium (Ctrl) or conditioned medium (CM) from RAW macrophages incubated without LPS and treated without or

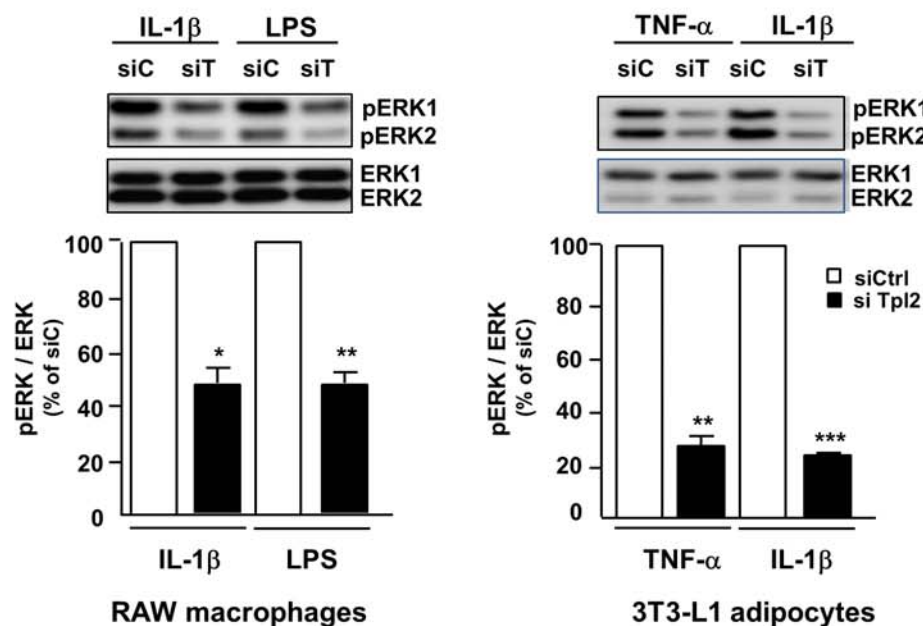
with a Tpl2 inhibitor (Tpl2-I, 5 μ M). Thereafter cells were incubated without or with insulin (1 nM) for 7 minutes and were lysed for pSer473-PKB and total PKB analysis by Western blot. A representative immunoblot is shown.

Supplemental Figure 1

A

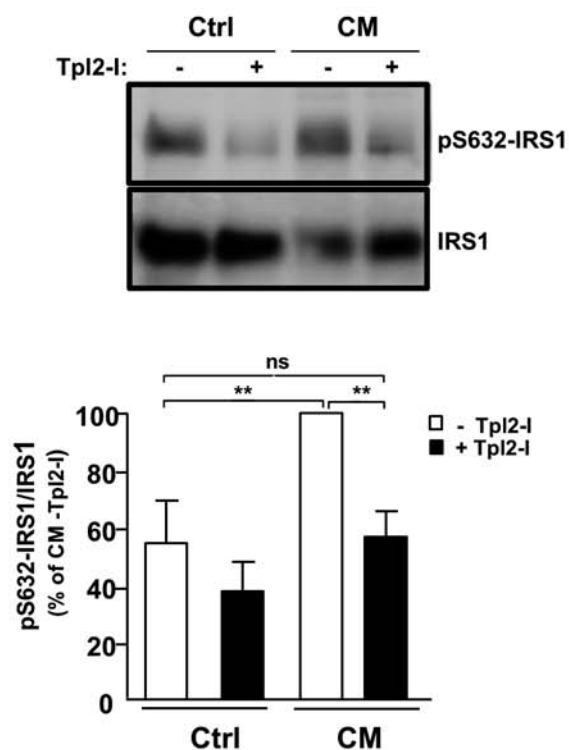


B

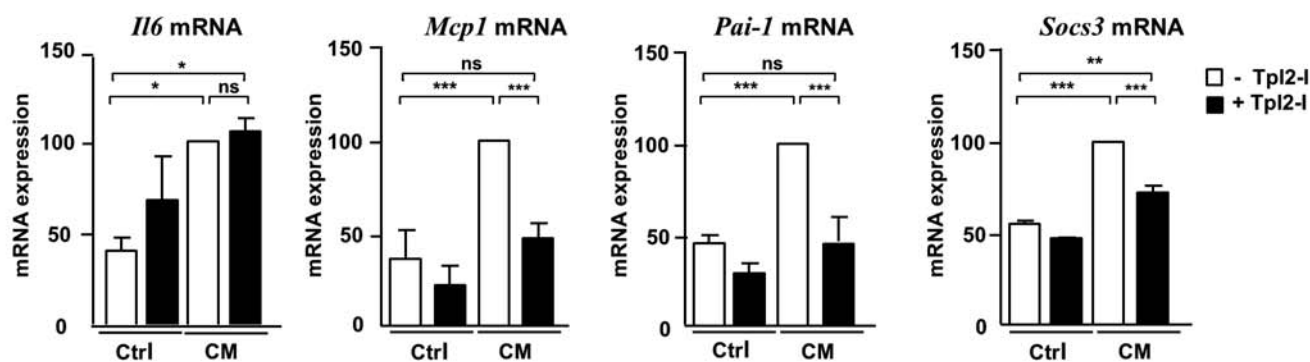


Supplemental Figure 2

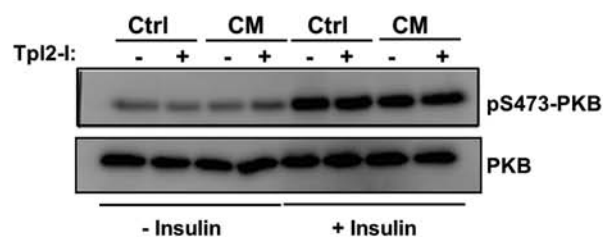
A



B



C



Article n°2

**Involvement of the Tpl2 kinase in COX-2 expression and prostaglandin E2
production in adipocytes**

Berthou F*, **Ceppo F***, Dumas K., Alemany S., Cormont M., Tanti JF

Cet article sera prochainement soumis

Objectifs

Les médiateurs lipidiques émergent comme de potentiels acteurs dans l'inflammation et les fonctions du tissu adipeux lors de l'obésité. Les prostaglandines, qui font partie de ces médiateurs lipidiques, peuvent être produits par les adipocytes mais également par les cellules de la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux. Les prostaglandines sont synthétisées par les enzymes COX (cyclo-oxygenase) à partir de l'acide arachidonique. Il existe deux isoformes de COX, COX-1 est exprimé constitutivement dans de nombreux types cellulaires, tandis que COX-2 est induit par différents stimuli inflammatoires tels que les cytokines (TNF α et IL-1 β) et le LPS. Dans le tissu adipeux, la prostaglandine E2 (PGE2) est le produit le plus abondant de COX-2, et ces deux acteurs participent activement à l'inflammation dans différents types cellulaires. De manière intéressante, l'inhibition de COX-2 diminue l'inflammation du tissu adipeux et prévient du développement de l'insulino-résistance. Ainsi l'expression de COX-2 et la production de PGE2 par les adipocytes en condition inflammatoire contribuent certainement aux dysfonctions du tissu adipeux d'individus obèses. Cependant, les voies de signalisations activées par des facteurs inflammatoires et impliquées dans l'expression de COX-2 dans les adipocytes restent encore mal connues.

La MAP3K Tpl2, activée spécifiquement par des stimuli inflammatoires, intervient dans la production de nombreux médiateurs de l'inflammation. Tpl2 est décrite pour activer les kinases ERK 1/2 mais également pour être impliquée dans l'activation d'autres voies de signalisations telles que NFAT et NF- κ B. Or ces facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de l'expression de COX-2 dans différents types cellulaires. Potentiellement au travers de ces facteurs de transcription, Tpl2 est également capable de contrôler l'expression de COX-2 avec selon le type cellulaire soit une induction soit une répression.

Nous avons donc voulu déterminer le rôle de Tpl2 dans la régulation de l'expression de COX-2 et la production de PGE2 dans les adipocytes en réponse à de stimuli inflammatoires.

Résultats

La stimulation d'adipocytes 3T3-L1 par des cytokines inflammatoires telles que le TNF α ou l'IL-1 β induit une augmentation de l'expression de COX-2 qui s'accompagne d'une

augmentation de la production de PGE2. On observe une synergie, au niveau de l'induction de l'ARNm de COX-2, lors de la stimulation des adipocytes avec un mix entre d'IL-1 β et de TNF α par rapport à l'action des cytokines seules. Les cytokines sont également capables d'induire l'augmentation des niveaux protéiques de COX-2. L'inhibition de Tpl2 dans les adipocytes soit pharmacologiquement soit par utilisation d'ARN interférents permet de réduire significativement l'expression de COX-2 induites par les cytokines tandis que des effets significatifs sur la production de PGE2 ne sont observées que lors de la stimulation avec le mix de cytokines (Figure 1).

L'étude des facteurs de transcription impliqués dans l'expression de COX-2 qui est régulée par Tpl2 ne semble pas faire intervenir le facteur CREB. En effet, aucune modification de la phosphorylation de CREB en réponse aux cytokines n'est observée lors de l'inhibition de Tpl2 alors qu'une diminution des phosphorylations de ERK 1/2 et p90Rsk sont observées. A l'inverse, il semble que le facteur NF- κ B participe à la régulation de l'expression de COX-2 lors d'une stimulation spécifiquement à l'IL-1 β . De manière intéressante NF- κ B ne participe pas au contrôle de l'expression de COX-2 en réponse au TNF α et au mix de cytokines (Figure 2). Il est décrit qu'une co-culture entre adipocytes et macrophages mime un état inflammatoire et induit la production de facteurs inflammatoires. Ainsi, la co-culture induit l'augmentation d'expression de COX-2 principalement dans les adipocytes et la sécrétion de prostaglandines, l'inhibition pharmacologique ou par invalidation de Tpl2 dans les adipocytes permet de diminuer l'augmentation de ces paramètres (Figure 3). L'implication de Tpl2 dans la régulation de COX-2 dans le tissu adipeux est démontrée *ex vivo* avec l'utilisation d'explants de tissu adipeux provenant de souris sauvages ou invalidées pour Tpl2. Ainsi on observe une réduction de l'expression de COX-2 dans les explants de souris invalidées pour Tpl2 en réponse au LPS par rapport aux explants de souris sauvages (Figure 4).

Conclusion

Cette étude met en évidence l'implication de Tpl2 dans la régulation de l'expression de COX-2 dans les adipocytes stimulés avec des cytokines. La production de PGE2 par les adipocytes qui est dépendante de COX-2 est également réduite lors de l'inhibition de Tpl2. Il semble que, dans les adipocytes, le facteur de transcription CREB ne soit pas impliqué dans la

régulation d'expression de COX-2 induite par les cytokines. Tandis que NF- κ B semble participer à l'induction de COX-2 spécifiquement en réponse à l'IL-1 β et ne semble pas impliqué dans la régulation de COX-2 lors d'une stimulation avec du TNF α . Il serait donc intéressant de déterminer la participation du facteur NFAT dans le contrôle de l'expression de COX-2 lors de la stimulation aux cytokines.

Lorsque les adipocytes sont placés en présence de macrophages on observe une augmentation de l'expression et de la production de PGE2 et ces augmentations semblent principalement provenir des adipocytes. Enfin Tpl2 participe à la régulation de COX-2 dans le tissu adipeux global comme l'indique l'étude d'explants de tissu adipeux provenant de souris déficiente pour Tpl2.

Involvement of the Tpl2 kinase in COX-2 expression and prostaglandin E2 production in adipocytes.

Flavien Berthou^{1,2,*}, Franck Ceppo^{1,2,*}, Karine Dumas^{1,2}, Suzana Alemany³, Mireille Cormont^{1,2}, Jean-François Tanti^{1,2,#}

¹ INSERM, U1065, C3M, Team 7 “Molecular and Cellular Physiopathology of Obesity and Diabetes”, 06204 Nice, France

² Université Nice Sophia Antipolis, C3M, 06204 Nice, France

³ Instituto Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CISC-UAM. 28029 Madrid, Spain

* Equal contribution

Running Title : Tpl2 controls COX-2 and PEG2 in adipocytes

Corresponding author : Dr. Jean-François Tanti

**INSERM U1065,
Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire,
Bâtiment Archimed, 151 route de St-Antoine-de-Ginestière
BP 2 3194, 06204 Nice cedex 3, France
Email : tanti@unice.fr
Phone number : +33 4 89 06 42 37
Fax number : +33 4 89 06 42 21**

Abstract

Obesity is associated with a low-grade inflammation of adipose tissue that leads to insulin resistance and to the onset of type 2 diabetes. Bioactive lipid mediators have emerged as potent regulator of adipose tissue inflammation and functions. Among them, Prostaglandins (PG) play a key role in inflammatory response and are produced by cyclooxygenases (COX) from arachidonic acid. However, inflammatory signaling pathways controlling COX-2 expression and PGE₂ production in adipocytes remain ill-defined. Here we demonstrate that the MAP3kinase Tpl2 controls COX-2 expression and PGE₂ secretion in adipocytes in response to inflammatory mediators. We found that in 3T3-L1 adipocytes, IL-1 β and IL-1 β +TNF- α induce COX-2 gene and protein expression and PGE₂ production. Pharmacological or siRNA mediated Tpl2 inhibition in adipocytes decreased by 50% COX-2 induction and PGE₂ production. COX-2 expression and PGE₂ production are also increased in a direct co-culture between adipocytes and macrophages. A pharmacological inhibition of Tpl2 in the co-culture or Tpl2 silencing in adipocytes markedly reduces these inductions. Further, pharmacological inhibition of Tpl2 in adipocytes reduces by 60% COX-2 expression induced by a conditioned medium from LPS-treated macrophages. Collectively, these data demonstrate that Tpl2 activation in adipocytes is necessary for COX-2 expression and PGE₂ production induced by cytokines-derived from macrophages. Importantly, Tpl2 expression in obese adipose tissue is necessary for LPS-induced COX-2 expression since we found that LPS is less efficient to induce COX-2 mRNA in explants of adipose tissue from obese Tpl2 KO mice as compared to obese wild-type mice.

Together, these data established that activation of Tpl2 in obese adipocytes could contribute to an increased COX-2 expression and production of PGE₂ that could participate in the modulation of adipose tissue inflammation during obesity.

Introduction

Obesity is associated with a state of low-grade inflammation of adipose tissue that contributes to its dysfunction. These adverse alterations of adipose tissue predispose to insulin resistance development and to the onset of type 2 diabetes (1, 2). Obese adipose tissue is infiltrated by immune cells including macrophages and a cross-talk between macrophages and adipocytes perpetuate a vicious cycle that sustained adipose tissue inflammation (3, 4). Inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α produced mainly by macrophages and free fatty acids or abnormal adipokines secretion by adipocytes are involved in this paracrine loop between adipocytes and macrophages (3, 5, 6). Furthermore, obesity is also characterized by an increase of lipopolysaccharides (LPS) circulating level due to a change in gut microbiota. LPS by activating macrophages in obese adipose tissue contribute to the chronic “low-grade” inflammation and to adipocyte dysfunction (7, 8). Thus, inflammatory mediators produced by macrophages or obese adipocytes contribute to the development of insulin resistance and other obesity-related metabolic complications.

Bioactive lipid mediators have emerged as potent regulator of adipose tissue inflammation and functions (9-11). Prostaglandins are synthesized from arachidonic acid by the cyclooxygenase (COX) pathway. Two isoforms of COX namely COX-1 and COX-2 exist but COX-1 is constitutively expressed in most tissues whereas COX-2 is induced by different inflammatory cytokines including IL-1 β and TNF- α or inflammatory mediators such as LPS (9, 12). The most abundant COX-2 product in adipose tissue is PGE₂ that is produced by both adipocytes and stromal cells in adipose tissue (9, 13). PGE₂ and COX-2 are important actors in inflammation in different cell types (14) and pharmacological inhibition of COX-2 impairs adipose tissue inflammation and prevents the development of insulin resistance (15-17). COX-2 dependent production of PGE₂ was also shown to alter the resolution of inflammation in obesity (18). In addition to inflammation, COX-2 and PGE₂ could also alter adipose tissue

development by suppressing adipogenesis (19-21). Thus, COX-2 expression and PGE₂ production in adipocytes in response to inflammatory mediators may contribute to obese adipose tissue dysfunction. However, the signalling pathways activated by inflammatory mediators and involved in the increased expression of COX-2 in adipocytes are not well understood.

Deregulation in mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling is a common alteration in obese tissues, including adipose tissue (22). Tumor Progression Locus 2 (Tpl2), also known as Cot, is a MAP kinase kinase kinase (MAP3K8) involved in the activation of ERK1/2 by phosphorylating MEK, the ERK kinase (23). Tpl2 has been described as the only one serine/threonine kinase involved in the activation of ERK1/2 in response to inflammatory stimuli such as IL-1 β , TNF- α and LPS in immune cells. Furthermore, Tpl2 activation is required for the production of IL-1 β and TNF- α by macrophages (24-26). Deregulation of Tpl2 expression was found in several inflammatory diseases as well as in some cancers (27, 28). Tpl2 expression is up-regulated in obese adipose tissue and Tpl2 activation by inflammatory cytokines is involved in lipolysis and in alteration of insulin signalling in adipocytes (29). Moreover, an implication of Tpl2 in the cross-talk between adipocytes and macrophages leading to the establishment of an inflammatory paracrine loop and to adipocyte insulin resistance was recently found (30). Studies of Tpl2 deficient mice have revealed a role of Tpl2 in obese adipose tissue inflammation (31, 32) even if the implication of Tpl2 in insulin resistance is still a matter of debate (31-33).

Tpl2 not only activates ERK1/2 signaling but it is also implicated in cross-talks with other signaling pathways including NFAT and nuclear factor kappa B (NF- κ B) (23, 34-36). These transcription factors are involved in the control of COX-2 expression in different cell types. Furthermore, depending on cellular context, Tpl2 could promote or repress COX-2 expression

and PGE2 production (35, 37-39). However, a role of Tpl2 in COX-2 regulation and PGE2 production in adipocytes in response to inflammatory mediators remains to be established.

Here, we demonstrate that Tpl2 positively control COX-2 expression and PGE2 secretion in adipocytes in response to IL-1 β and TNF- α and in response to inflammatory mediators derived from LPS-activated macrophages. Further, we provide evidences that COX-2 induction was reduced in adipose tissue of Tpl2 deficient mice.

Material and methods

Reagents and antibodies

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum and antibiotics were purchased from Invitrogen (Life Technologies SAS, Saint Aubin, France). INTERFERin® transfection reagent was from Polyplus transfection (Illkirch, France). Protease inhibitors cocktails were obtained from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). The Tpl2 kinase inhibitor (4-(3-chloro-4-fluorophenylamino)-6-(pyridine-3-yl-methylamino)-3-cyano-[1,7]-naphthyridine) (40, 41) was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Murine IL-1 β and TNF- α were purchased from PeproTech (Neuilly-sur-Seine, France). Lipopolysaccharide (LPS) from E. Coli 0111:B4 strain and all other chemical reagents were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). siRNAs against Tpl2 or p65 NF- κ B were purchased from Dharmacon (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA). Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were purchased from Millipore (Bedford, MA, USA). BCA reagent was obtained from Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA). Enhanced chemiluminescence reagent was purchased from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA, USA).

Antibodies against Tpl2, COX-2, Hsp90, phospho-Ser276 p65NF- κ B and total-p65NF- κ B were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Clinisciences, France). All other antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were obtained from Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

Culture of 3T3-L1 adipocytes and RAW264.7 macrophages

3T3-L1 pre-adipocytes were differentiated into adipocytes as previously described and used 10 days after the initiation of differentiation (42). RAW264.7 macrophages (thereafter

referred as RAW macrophages) were maintained in DMEM containing 5% (vol/vol) heat-inactivated fetal bovine serum and antibiotics at 37°C and 5% CO₂/95% air atmosphere.

Co-culture between adipocytes and macrophages

A direct co-culture between 3T3-L1 adipocytes and RAW264.7 macrophages was performed as previously described (6, 30). Briefly, RAW macrophages (3×10^5 cells) were seeded onto 12-well plates containing 3T3-L1 adipocytes (6×10^5 cells). After 4h, the medium was changed for fresh medium with vehicle (DMSO) or with the Tpl2 inhibitor (5 μ M). The medium was collected 24h later for the measurement of PGE₂ secretion and cells were lysed for mRNA or protein preparation. As control, cells were cultured separately, treated exactly with the same conditions and mixed after harvest. In the transwell system, cells were co-cultured as previously described (6). Briefly, transwell inserts with a 0.4- μ m porous membrane (Corning) were used to separate adipocytes from macrophages. After incubation for 24 hours, adipocytes in the lower well were harvested.

Tpl2 silencing was performed in 3T3-L1 adipocytes by using Tpl2 siRNA (50 nM) and INTERFERin® following the reverse transfection protocol (43). RAW macrophages were seeded onto siTpl2-treated adipocytes 24h after transfection. The cells and the medium were harvested 24h later as described above.

Treatment of 3T3-L1 adipocytes with the conditioned medium from LPS-activated RAW264.7 macrophages

Adipocytes were treated with conditioned medium from LPS-activated RAW macrophages (8×10^5 cells /well for a 6-well plate) as previously described (30). Briefly, RAW macrophages were incubated with LPS (0.5 ng/ml) for 24h. Then, the conditioned medium (CM) was collected and transferred for 24 h onto 3T3-L1 adipocytes incubated without or with Tpl2

inhibitor (5 μ M) (1 ml of CM/well of a 12-well plate). As control, culture medium containing the same concentration of LPS was added onto adipocytes.

Adipose tissue explants from wild-type and Tpl2 knockout mice

C57BL/6J WT and C57BL/6J Tpl2^{-/-} littermates were produced as previously described (38). Adipose tissue explants were prepared from epididymal fat pads and incubated without or with LPS (100 ng/ml) for 24 h in DMEM containing 10 % fetal bovine serum and antibiotic at 37°C and 5% CO₂/95% air atmosphere. After three washes in PBS, adipose tissue explants were then frozen in liquid nitrogen and store at -80 °C before mRNA extraction.

Principles of laboratory animal care (NIH publication no. 85–23, revised 1985; <http://grants1.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm>) were followed, as well those of the European Union guidelines on animal laboratory care. All procedures were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Medicine of the Nice Sophia Antipolis University (CIEPAL).

Western-blot analysis

Proteins from cell lysates were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes as previously described (42). Membranes were then incubated with the appropriate primary and secondary antibodies. Chemiluminescence was detected using Fujifilm LAS-3000 (Fujifilm Life Science, Courbevoie, France). Quantifications were realized using MultiGauge software (Fujifilm Life Science).

Real-time RT-PCR

RNAs were prepared using the RNeasy total RNA kit (Qiagen, Courteboeuf, France), treated with DNase (Applied Biosystems) and used to synthesize cDNAs using Transcriptor First

Strand cDNA Synthesis kit (Roche, France). Real-time quantitative PCR was performed with sequence detection systems (ABI PRISM 7500; Applied Biosystems) and SYBR green dye as described (42). COX-2 mRNA expression was normalized with mouse *Rplp0* mRNA. The relative amount of mRNA between two groups was determined by using the second derivative maximum method. Primers used were from SABiosciences (Qiagen, Courteboeuf, France).

Quantification of PGE2

PGE2 production in culture medium was measured by enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) following the manufacturer's protocol.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software. Differences between groups were tested for significance by ANOVA with *post hoc* analysis or by Student's t test. *p* value <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Tpl2 in 3T3-L1 adipocytes regulates COX-2 expression and PGE2 secretion induced by inflammatory cytokines.

To test the involvement of Tpl2 in COX-2 gene expression in response to inflammatory cytokines in adipocytes, 3T3-L1 adipocytes were incubated with a pharmacological inhibitor of Tpl2 (Tpl2-I) and then treated with IL-1 β , TNF- α or a mix of these two cytokines (MIX). IL-1 β (Fig. 1A) and TNF- α (data not shown) induce COX-2 mRNA expression by 5-fold whereas both IL-1 β +TNF- α increase strongly this expression (22-fold), due to a synergistic effect between these two cytokines. Interestingly, Tpl2 inhibition prevented COX-2 gene expression by approximately 45 and 60% respectively, in response to the MIX, and by 25% in response to IL-1 β treatment (Fig. 1A). IL-1 β and the cytokine mix also induced COX-2 protein by 1.6 and 2.5 fold respectively whereas the Tpl2 inhibitor totally abolished these effects (Fig. 1B). Moreover, the cytokine mix significantly increased PGE2 secretion and Tpl2 inhibition reduced by around 30 % PGE2 secretion induced by the cytokine mix (Fig.1D). We observed a trend towards an increase in PGE2 secretion following IL-1 β stimulation that did not reach statistical significance.

To confirm the involvement of Tpl2 in COX-2 mRNA expression, 3T3-L1 adipocytes were transfected with a siRNA against Tpl2. Tpl2 silencing prevented by 50% both IL-1 β - and Mix-induced COX-2 gene expression and markedly reduced the induction of COX-2 protein (Fig. 1D, E). PGE2 secretion in response to the cytokine mix was also reduced by 30 % following Tpl2 silencing (Fig. 1F)

The Tpl2/NF- κ B axis is involved in the induction of COX-2 mRNA in response to IL-1 β but not to the cytokine mix.

We then investigated the transcription factor(s) potentially involved in this induction of COX-2 in response to Tpl2 activation. The promoter of COX-2 contains binding sites for different transcription factors including NF- κ B, CREB and NFAT that have been shown to be regulated by Tpl2 in different cell types(23, 34-36, 39) . Especially, CREB has been reported to be activated by Msk1 and p90Rsk in macrophages following the activation of the Tpl2/ERK pathway (39). Our data addressing the implication of Tpl2 in the cytokine-induced activation of CREB in adipocytes revealed that pharmacological inhibition of Tpl2 did not markedly modify CREB phosphorylation although ERK1/2 and p90Rsk activation were markedly reduced (Fig. 2A). Thus, this data suggested that CREB did not contribute significantly to the induction of COX-2 following activation of Tpl2 by IL-1 β or the cytokine mix.

NF- κ B controls many genes involved in inflammation and Tpl2 is involved in the phosphorylation of NF- κ B on Serine276 that stimulates transactivation by NF- κ B (36). We found that the pharmacological inhibition of Tpl2 in 3T3-L1 adipocytes reduced the phosphorylation of NF- κ B on this site in response to IL-1 β or to the cytokine mix (Fig. 2B). We thus thought to determine whether NF- κ B activation was required for the induction of COX-2 induced by the inflammatory cytokines. To this aim, 3T3-L1 adipocytes were transfected with a siRNA against p65NF- κ B subunit and then treated with IL-1 β , or the cytokine mix with or without the pharmacological inhibitor of Tpl2 (Tpl2i, 10 μ M).

The silencing of p65 reduced by 35% the IL-1 β -induced COX-2 mRNA expression (Fig. 2C). This decrease was similar to the reduction in COX-2 mRNA expression obtained in 3T3-L1 adipocytes treated with the Tpl2 inhibitor and the control siRNA (Fig. 2C). Furthermore, the pharmacological inhibition of Tpl2 had a modest effect on COX-2 mRNA expression following p65 silencing (Fig. 2C). All together, these data suggest that the Tpl2-NF- κ B

pathway was involved, at least in part, in the induction of COX-2 expression in response to IL-1 β .

By contrast, silencing of p65 increased the expression of COX-2 mRNA in response to a cytokine mix that was inhibited by the pharmacological inhibitor of Tpl2 (Fig. 2D). Similar results were obtained when the effect of TNF- α alone was investigated (data not shown). These data suggest that NF- κ B was not required for Tpl2-induced COX-2 expression in response to a cytokine mix of IL-1 β and TNF- α .

Tpl2 activity in adipocytes regulates COX-2 expression and PGE2 secretion induced by a co-culture between macrophages and adipocytes.

Co-culture experiments between adipocytes and macrophages suggest that a paracrine loop between these cell types could contribute to the production of inflammatory mediators in obese adipose tissue (6). We recently demonstrated that Tpl2 was involved in the crosstalk between adipocytes and macrophages (30). We thus aimed at determining the impact of a direct co-culture between RAW264.7 macrophages and 3T3-L1 adipocytes on COX-2 expression and PGE2 production and the effect of Tpl2 inhibition.

Contact co-culture increased COX-2 mRNA and protein expression as compared to cells cultured separately (Fig. 3A, B). Importantly, Tpl2 inhibition in the co-culture totally prevented COX-2 induction at both gene and protein levels (Fig. 3A, B). To determine in which cell types COX-2 induction occurred, we performed co-culture in a transwell system in order to separate adipocytes and macrophages (6). We found that COX-2 mRNA was induced in the adipocytes (Fig. 3C) whereas we did not observe clear induction in the macrophages (data not shown). Importantly, the Tpl2 inhibitor markedly reduced the induction of COX-2 in the adipocytes (Fig. 3C). Furthermore, in the contact co-culture system, Tpl2 knockdown in adipocytes markedly reduced COX-2 mRNA and protein induction strongly supporting that

Tpl2 in adipocytes mediate the induction of COX-2 (Fig. 3D and E). Accordingly, PGE2 secretion in the contact co-culture system was reduced when Tpl2 was down-regulated in adipocytes by using specific siRNA (Fig. 3F).

These data suggest that in this co-culture system, secreted inflammatory mediators produced mainly by macrophages as we previously reported (30) may activate the Tpl2-COX2 pathway in adipocytes leading to PGE2 secretion by the adipocytes.

Tpl2 activity in adipocyte is required for COX-2 induction in response to conditioned medium from LPS-activated macrophages

Obesity is associated to an increase of LPS circulating level derived from gut microbiota and LPS participates to the inflammation of obese adipose tissue through activation of adipose tissue macrophages. Cytokines produced by LPS-activated macrophages up-regulate the expression of inflammatory mediators in adipocytes (7, 8). Using conditioned medium (CM), we thus investigated whether pro-inflammatory cytokines secreted by LPS-activated macrophages could induce COX-2 expression in adipocytes by activating Tpl2. We found that the expression of COX-2 mRNA and protein were markedly induced when 3T3-L1 adipocytes were exposed to CM from LPS-treated RAW macrophages. This induction was nearly totally prevented when 3T3-L1 adipocytes were incubated with the pharmacological Tpl2 inhibitor (Fig. 4A, B).

This data indicate that Tpl2 activation in adipocytes is required for the induction of COX-2 induced by pro-inflammatory mediators produced by LPS-activated macrophages.

Tpl2 deficiency reduces LPS-stimulated COX-2 expression in adipose tissue explants.

We next investigated whether Tpl2 was necessary for the expression of COX-2 in adipose tissue under inflammatory conditions. To this aim, we used explants of adipose tissue from

wild-type (WT) and Tpl2 knockout mice (Tpl2 KO) mice. Explants of epididymal adipose from WT and Tpl2 KO mice were incubated without or with LPS (100 ng/ml) for 24h before the measurement of COX-2 mRNA expression. LPS increased COX-2 mRNA expression in adipose tissue from WT mice and importantly this effect was nearly abolished in adipose tissue from Tpl2 KO mice (Fig. 4C) indicating that Tpl2 was necessary for the induction of COX-2 in adipose tissue.

Discussion

Prostaglandins are synthesised following the activation of the cyclooxygenase COX-2 by inflammatory mediators and COX-2 activation and enhanced production of PGE₂ has been linked to obesity-induced inflammation and to alteration in adipose tissue development (9). Deregulation of signalling pathways controlling COX-2 expression in adipocytes and in adipose tissue in obesity could thus participate in adipose tissue inflammation and dysfunctions. The MAP3K8 Tpl2 plays an important role in immune and inflammatory responses (28) and deregulation of its expression was found in obese adipose tissue (44). We recently found that Tpl2 was involved in an inflammatory paracrine loop between adipocytes and macrophages that could sustain adipose tissue inflammation (30). Furthermore, different studies have shown that obese Tpl2 deficient mice have reduced expression of inflammatory markers in adipose tissue (31, 32) even if the impact on insulin resistance is still unclear (31-33).

Here we provide evidences that Tpl2 activation by inflammatory cytokines is required for the induction of COX-2 in adipocytes. Specifically, we showed that pharmacological or siRNA-mediated inhibition of Tpl2 in adipocytes markedly reduced the induction of COX-2 in response to IL-1 β or to IL-1 β and TNF- α . The synthesis of PGE₂ by adipocytes which depends on COX-2, was also reduced in this experimental conditions. Thus, our data indicate that Tpl2 in adipocytes is a positive regulator of COX-2 expression and PGE₂ production as previously shown in macrophages, T cells and intestinal myofibroblasts (35, 39, 45). By contrast, in other cellular contexts Tpl2 negatively regulates COX-2 expression and PGE₂ production (37).

In macrophages, the ability of Tpl2 to regulate COX-2 in response to LPS is dependent on CREB (39). In adipocytes it seems unlikely that CREB was involved in the induction of COX-2 mediated by IL-1 β or IL-1 β and TNF- α since we did not observe modification in

CREB phosphorylation after Tpl2 inhibition. The Tpl2/ERK pathway has been shown to cross-talk with NF- κ B by inducing the phosphorylation of p65 NF- κ B on serine276 that stimulates transactivation by NF- κ B (36). We found that the phosphorylation of this site in adipocytes in response to IL-1 β or the cytokine mix was decreased by the inhibition of Tpl2 suggesting that NF- κ B could be involved in COX-2 induction downstream of Tpl2. However, the role of NF- κ B in the control of COX-2 in adipocytes appears different depending on the cytokines used. Indeed, we found that the silencing of p65 NF- κ B mimicked the effect of Tpl2 inhibition on COX-2 induction in response to IL-1 β . Further, in p65 siRNA-treated adipocytes, the Tpl2 inhibitor did not further markedly reduced COX-2 expression. These findings suggest that Tpl2 controls COX-2 expression, at least in part, through NF- κ B in response to IL-1 β stimulation. By contrast, NF- κ B activation was not involved in the COX-2 expression when adipocytes were stimulated with a cytokine mix containing both IL-1 β and TNF- α . Indeed, silencing of p65 NF- κ B in this condition increased the expression of COX-2 and pharmacological inhibition of Tpl2 in p65 siRNA-treated adipocytes markedly decreased COX-2 mRNA level. The observed difference on NF- κ B dependency was mainly due to TNF- α since same results were obtained in adipocytes stimulated with TNF- α alone (data not shown). Further analysis remains to be done to identify the transcription factors involved in the control of COX-2 expression in response to the cytokine mix but NFAT could be a potential candidate since it has been reported that Tpl2 induced COX-2 expression in T cells through NFAT activation (35). Moreover, the mechanisms of a negative cross-talk between this transcription factor and NF- κ B remain to be investigated.

Since PGE₂ is well-known to have pro-inflammatory effects on macrophages (12), an increased production of this prostaglandin mediated by the Tpl2-COX-2 pathway in adipocytes could participate in the establishment of an inflammatory paracrine loop in the obese adipose tissue. Co-culture between adipocytes and macrophages provides experimental

model to investigate actors involved in this paracrine inflammatory loop (6). We found COX-2 expression and PGE2 secretion increased in a co-culture system between adipocytes and macrophages. Importantly the pharmacological inhibition of Tpl2 markedly prevented the up-regulation of COX-2 expression. The increased COX-2 expression was mainly observed in adipocytes and silencing of Tpl2 in co-cultured adipocytes reduced both COX-2 expression and the production of PGE2. LPS derived from gut microbiota is another important contributor of adipose tissue macrophage activation and we found that conditioned medium from LPS-activated macrophages increased COX-2 expression in adipocytes. Similar to the co-culture findings, we found that Tpl2 inhibition in adipocytes markedly prevented the up-regulation of COX-2 expression induced by the conditioned medium from macrophages. It is therefore likely that inflammatory cytokines produced mainly by macrophages in the co-culture or following LPS stimulation increased COX-2 expression and PGE2 synthesis in adipocytes by activating Tpl2. Thus, we postulate that deregulation of Tpl2 in obese adipose tissue (44) could participate to an increase in COX-2 expression. Accordingly, we found that the COX-2 induction by LPS was lower in adipose tissue explants from Tpl2 knockout mice compared to wild-type highlighting an important role of Tpl2 in adipose tissue for the regulation of COX-2 expression. Thus, activation of Tpl2 in obese adipocytes could contribute to an increased production of PGE2 in obesity that could participate in the modulation of adipose tissue inflammation.

In conclusion, this study demonstrates that Tpl2 in adipocytes regulates the expression of COX-2 and the production of PGE2 in response to IL-1 β and TNF- α and also in response to inflammatory mediators produced by macrophages. Further, our study indicates that COX-2 induction by inflammatory mediators was reduced *ex vivo* in adipose tissue of Tpl2 deficient mice. Whereas NF- κ B is involved in Tpl2-induced COX-2 expression in response to IL-1 β , it is dispensable for the regulation of COX-2 by Tpl2 in response to TNF- α or a to cytokine mix

of IL-1 β and TNF- α . Since it was recently shown that Tpl2 affects the expression of a specific set of inflammatory mediators in obese adipose tissue (32), we propose that PGE₂ produced by the activation of COX-2 could be added to the subset of these inflammatory mediators controlled by Tpl2 in adipocytes and adipose tissue during obesity.

Acknowledgments

The authors would like to thank Frédéric Bost, and Sophie Giorgetti-Péraldi (INSERM U1065, C3M, Nice) for critical reading of the manuscript and helpful discussions. Véronique Corcelle and the animal facility staff (INSERM U1065, C3M, Nice) for animal care and breeding.

This work was supported by INSERM, the Université de Nice Sophia Antipolis, ANR grant 2010-BLAN-1117-01 (to J.F.T), LABEX SIGNALIFE (ANR-11-LABX-0028-01) and Alfediam-Abbott grant (to J.F.T). F.C. was supported by an INSERM/ Région Provence Alpes-Cote d’Azur doctoral fellowship and by a grant from the Société Francophone du Diabète (SFD).

References

1. **Gregor MF, Hotamisligil GS** 2011 Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 29:415-445
2. **Sun S, Ji Y, Kersten S, Qi L** 2012 Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annu Rev Nutr* 32:261-286
3. **Exley MA, Hand L, O'Shea D, Lynch L** 2014 Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. *J Endocrinol* 223:R41-R48
4. **McNelis JC, Olefsky JM** 2014 Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity* 41:36-48
5. **Suganami T, Mieda T, Itoh M, Shimoda Y, Kamei Y, Ogawa Y** 2007 Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochemical and biophysical research communications* 354:45-49

6. **Suganami T, Nishida J, Ogawa Y** 2005 A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2062-2068
7. **Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R** 2007 Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1761-1772
8. **Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S** 2012 Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336:1262-1267
9. **González-Périz A, Claria J** 2010 Resolution of adipose tissue inflammation. *ScientificWorldJournal* 10:832-856
10. **Horrillo R, Gonzalez-Periz A, Martinez-Clemente M, Lopez-Parra M, Ferre N, Titos E, Moran-Salvador E, Deulofeu R, Arroyo V, Claria J** 2010 5-lipoxygenase activating protein signals adipose tissue inflammation and lipid dysfunction in experimental obesity. *J Immunol* 184:3978-3987
11. **Mothe-Satney I, Filloux C, Amghar H, Pons C, Bourlier V, Galitzky J, Grimaldi PA, Feral CC, Bouloumie A, Van Obberghen E, Neels JG** 2012 Adipocytes secrete leukotrienes: contribution to obesity-associated inflammation and insulin resistance in mice. *Diabetes* 61:2311-2319
12. **Ricciotti E, FitzGerald GA** 2010 Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:986-1000
13. **Fain JN, Kanu A, Bahouth SW, Cowan GS, Jr., Hiler ML, Leffler CW** 2002 Comparison of PGE₂, prostacyclin and leptin release by human adipocytes versus explants of adipose tissue in primary culture. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 67:467-473

14. **Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y** 2014 Prostaglandin E-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta*
15. **Ghoshal S, Trivedi DB, Graf GA, Loftin CD** 2011 Cyclooxygenase-2 deficiency attenuates adipose tissue differentiation and inflammation in mice. *J Biol Chem* 286:889-898
16. **Hsieh PS, Lu KC, Chiang CF, Chen CH** 2010 Suppressive effect of COX2 inhibitor on the progression of adipose inflammation in high-fat-induced obese rats. *Eur J Clin Invest* 40:164-171
17. **Hsieh PS, Jin JS, Chiang CF, Chan PC, Chen CH, Shih KC** 2009 COX-2-mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver. *Obesity (Silver Spring)* 17:1150-1157
18. **Hellmann J, Zhang MJ, Tang Y, Rane M, Bhatnagar A, Spite M** 2013 Increased saturated fatty acids in obesity alter resolution of inflammation in part by stimulating prostaglandin production. *J Immunol* 191:1383-1392
19. **Fujimori K, Yano M, Miyake H, Kimura H** 2014 Termination mechanism of CREB-dependent activation of COX-2 expression in early phase of adipogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 384:12-22
20. **Chu X, Nishimura K, Jisaka M, Nagaya T, Shono F, Yokota K** 2010 Up-regulation of adipogenesis in adipocytes expressing stably cyclooxygenase-2 in the antisense direction. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 91:1-9
21. **Fujimori K, Yano M, Ueno T** 2012 Synergistic suppression of early phase of adipogenesis by microsomal PGE synthase-1 (PTGES1)-produced PGE2 and aldo-keto reductase 1B3-produced PGF2 α . *PLoS One* 7:e44698
22. **Tanti JF, Ceppo F, Jager J, Berthou F** 2013 Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:181

23. **Gantke T, Sriskantharajah S, Sadowski M, Ley SC** 2012 IkappaB kinase regulation of the TPL-2/ERK MAPK pathway. *Immunol Rev* 246:168-182
24. **Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin JH, Patriotis C, Jenkins NA, Copeland NG, Kollias G, Tsichlis PN** 2000 TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 103:1071-1083
25. **Rousseau S, Papoutsopoulou M, Symons A, Cook D, Lucocq JM, Prescott AR, O'Garra A, Ley SC, Cohen P** 2008 TPL2-mediated activation of ERK1 and ERK2 regulates the processing of pre-TNF alpha in LPS-stimulated macrophages. *J Cell Sci* 121:149-154
26. **Mielke LA, Elkins KL, Wei L, Starr R, Tsichlis PN, O'Shea JJ, Watford WT** 2009 Tumor progression locus 2 (Map3k8) is critical for host defense against listeria monocytogenes and IL-1beta production. *J Immunol* 183:7984-7993
27. **Vougioukalaki M, Kanellis DC, Gkouskou K, Eliopoulos AG** 2011 Tpl2 kinase signal transduction in inflammation and cancer. *Cancer Lett* 304:80-89
28. **Gantke T, Sriskantharajah S, Ley SC** 2011 Regulation and function of TPL-2, an IkappaB kinase-regulated MAP kinase kinase kinase. *Cell Res* 21:131-145
29. **Jager J, Gremeaux T, Gonzalez T, Bonnafous S, Debard C, Laville M, Vidal H, Tran A, Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Cormont M, Tanti JF** 2010 The Tpl2 kinase is up-regulated in adipose tissue in obesity and may mediate IL-1{beta} and TNF-{alpha} effects on ERK activation and lipolysis. *Diabetes* 59:61-70
30. **Ceppo F, Berthou F, Jager J, Dumas K, Cormont M, Tanti JF** 2014 Implication of the Tpl2 kinase in inflammatory changes and insulin resistance induced by the interaction between adipocytes and macrophages. *Endocrinology* 155:951-964

31. **Perfield JW, 2nd, Lee Y, Shulman GI, Samuel VT, Jurczak MJ, Chang E, Xie C, Tsiichlis PN, Obin MS, Greenberg AS** 2011 Tumor progression locus 2 (TPL2) regulates obesity-associated inflammation and insulin resistance. *Diabetes* 60:1168-1176
32. **Ballak DB, van Essen P, van Diepen JA, Jansen H, Hijmans A, Matsuguchi T, Sparrer H, Tack CJ, Netea MG, Joosten LA, Stienstra R** 2014 MAP3K8 (TPL2/COT) affects obesity-induced adipose tissue inflammation without systemic effects in humans and in mice. *PLoS One* 9:e89615
33. **Lancaster GI, Kowalski GM, Estevez E, Kraakman MJ, Grigoriadis G, Febbraio MA, Gerondakis S, Banerjee A** 2012 Tumor progression locus 2 (Tpl2) deficiency does not protect against obesity-induced metabolic disease. *PLoS One* 7:e39100
34. **Gomez-Casero E, San-Antonio B, Iniguez MA, Fresno M** 2007 Cot/Tpl2 and PKCzeta cooperate in the regulation of the transcriptional activity of NFATc2 through the phosphorylation of its amino-terminal domain. *Cell Signal* 19:1652-1661
35. **de Gregorio R, Iniguez MA, Fresno M, Alemany S** 2001 Cot kinase induces cyclooxygenase-2 expression in T cells through activation of the nuclear factor of activated T cells. *J Biol Chem* 276:27003-27009
36. **Das S, Cho J, Lambertz I, Kelliher MA, Eliopoulos AG, Du K, Tsiichlis PN** 2005 Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF-kappaB in a cell-type and stimulus-specific manner. *J Biol Chem* 280:23748-23757
37. **DeCicco-Skinner KL, Nolan SJ, Deshpande MM, Trovato EL, Dempsey TA, Wiest JS** 2013 Altered prostanoid signaling contributes to increased skin tumorigenesis in Tpl2 knockout mice. *PLoS One* 8:e56212
38. **Soria-Castro I, Krzyzanowska A, Pelaez ML, Regadera J, Ferrer G, Montoliu L, Rodriguez-Ramos R, Fernandez M, Alemany S** 2010 Cot/tpl2 (MAP3K8) mediates

myeloperoxidase activity and hypernociception following peripheral inflammation. *J Biol Chem* 285:33805-33815

39. **Eliopoulos AG, Dumitru CD, Wang CC, Cho J, Tsihlis PN** 2002 Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *Embo J* 21:4831-4840
40. **Hatzia Apostolou M, Polytarchou C, Panutsopoulos D, Covic L, Tsihlis PN** 2008 Proteinase-activated receptor-1-triggered activation of tumor progression locus-2 promotes actin cytoskeleton reorganization and cell migration. *Cancer Res* 68:1851-1861
41. **Gavrin LK, Green N, Hu Y, Janz K, Kaila N, Li HQ, Tam SY, Thomason JR, Gopalsamy A, Ciszewski G, Cuzzo JW, Hall JP, Hsu S, Telliez JB, Lin LL** 2005 Inhibition of Tpl2 kinase and TNF- α production with 1,7-naphthyridine-3-carbonitriles: synthesis and structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem Lett* 15:5288-5292
42. **Jager J, Gremeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF** 2007 Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 148:241-251
43. **Kilroy G, Burk DH, Floyd ZE** 2009 High efficiency lipid-based siRNA transfection of adipocytes in suspension. *PLoS One* 4:e6940
44. **Jager J, Corcelle V, Gremeaux T, Laurent K, Waget A, Pages G, Binetruy B, Le Marchand-Brustel Y, Burcelin R, Bost F, Tanti JF** 2011 Deficiency in the extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) protects leptin-deficient mice from insulin resistance without affecting obesity. *Diabetologia* 54:180-189
45. **Roulis M, Nikolaou C, Kotsaki E, Kaffe E, Karagianni N, Koliarakis V, Salpea K, Ragoussis J, Aidinis V, Martini E, Becker C, Herschman HR, Vetrano S, Danese S, Kollias G** 2014 Intestinal myofibroblast-specific Tpl2-Cox-2-PGE2 pathway links innate sensing to epithelial homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*

Figure Legends

Figure 1: Tpl2 inhibition in 3T3-L1 adipocytes decreases the induction of COX-2 and the secretion of PGE2 in response to IL-1 β or to a cytokine mix. (A-C) 3T3-L1 adipocytes were treated without (vehicle, DMSO) or with a pharmacological inhibitor of Tpl2 (Tpl2-I, 5 μ M) and then stimulated or not with IL-1 β alone (10 ng/ml) or IL-1 β and TNF- α (MIX, 10 ng/ml each). (A) Relative amount of COX-2 mRNA expression determined by real-time PCR following 4h of incubation with the cytokines. The mRNA expression was normalized using mouse *Rplp0* mRNA level and expressed in arbitrary units with the control conditions taken as 1. Data are presented as means \pm SEM of 4 independent experiments. (B) Western blot analysis of COX-2 expression with Hsp90 as loading control after 16 h of incubation with the cytokines. Representative immunoblots and means \pm SEM of 4 independent experiments are shown. (C) PGE2 secretion in the cultured medium after 16 h of incubation with the cytokines. Data are presented as means \pm SEM of 4 independent experiments. (D-F) 3T3-L1 adipocytes were treated with control siRNA (siCtrl) or Tpl2 siRNA (siTpl2) for 48 h and then stimulated for 4h with the cytokines for the measurement of COX-2 mRNA expression (D) or for 16h for the measurement of COX-2 protein expression (E) and PGE2 secretion (F). Representative immunoblots and means \pm SEM of 4 independent experiments are shown. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 2: NF- κ B is involved in Tpl2-induced COX-2 mRNA expression in response to IL-1 β but not to the cytokine mix. (A, B) 3T3-L1 adipocytes were incubated without or with a Tpl2 inhibitor (Tpl2-I, 30 μ M) and then stimulated or not with IL-1 β (10 ng/ml) or IL-1 β and TNF- α (MIX, 10 ng/ml each) for 20 min. Cells were lysed for Western blot analysis of (A) phospho- and total ERK1/2, phospho- and total p90Rsk and phospho- and total CREB

and (B) phosphor-ERK1/2 and pSer276 NF- κ B with Hsp90 as loading control. Representative immunoblots are shown. (C, D) 3T3-L1 adipocytes were treated with control siRNA (siCtrl) or p65 NF- κ B siRNA (sip65) and stimulated or not with IL-1 β (C) or the cytokine mix (D) in the absence or presence of a Tpl2 inhibitor (Tpl2i, 10 μ M). The relative amount of COX-2 mRNA expression was determined by real-time PCR following 4h of incubation with the cytokines. The mRNA expression was normalized using mouse *Rplp0* mRNA level. Data are expressed as a percentage of COX-2 mRNA in siCtrl-treated adipocytes stimulated with IL-1 β or the cytokine mix and presented as means \pm SEM of 4 independent experiments. The inset in (C) shows a representative immunoblot of the down-regulation of p65 NF- κ B in sip65 treated adipocytes with Hsp90 as loading control. *** $p < 0.001$.

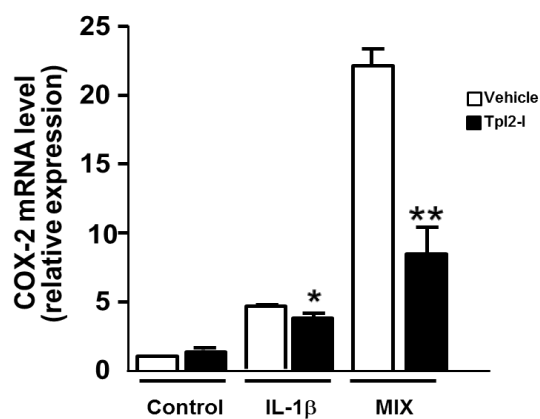
Figure 3 : The pharmacological inhibition of Tpl2 or its silencing in adipocytes prevents the induction of COX-2 and the secretion of PGE2 induced by a co-culture between adipocytes and macrophages. (A) 3T3-L1 adipocytes and RAW macrophages were cultured separately (A+M) or co-cultured (Coc) for 24 hours with DMSO (vehicle) or with a Tpl2 inhibitor (Tpl2-I, 5 μ M). Relative amount of COX-2 mRNA expression was determined by real-time PCR. The mRNA expression was normalized using mouse *Rplp0* mRNA level. Data are expressed as a percentage of COX-2 mRNA in co-cultured cells treated with vehicle and presented as means \pm SEM of 4 independent experiments. (B) Western blot analysis of COX-2 protein expression with Hsp90 as loading control in the same experimental conditions as in (A). Representative immunoblots and means \pm of 4 independent experiments are presented. (C) 3T3-L1 adipocytes and RAW macrophages were cultured together in the transwell system or cultured separately without (vehicle, DMSO) or with a Tpl2 inhibitor (Tpl2-I, 5 μ M) for 24h. The relative amount of COX-2 mRNA in adipocytes was determined by real-time PCR as in (A) and presented as means \pm SEM of 3 independent experiments. (D)

3T3-L1 adipocytes treated with a Ctrl siRNA (Adipo siCtrl) or with a Tpl2 siRNA (Adipo siTpl2) were cultured with RAW macrophages either separately (A+M) or together (Coc) for 24 h. Relative amount of COX-2 mRNA expression was determined by real-time PCR and presented as means \pm SEM of 4 independent experiments. (E) Western blot analysis of COX-2 protein expression with Hsp90 as loading control in the same experimental conditions as in (C). Representative immunoblots are presented. (F) PGE2 amount in the medium in the same experimental conditions as in (C). Data are means \pm SEM of 4 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

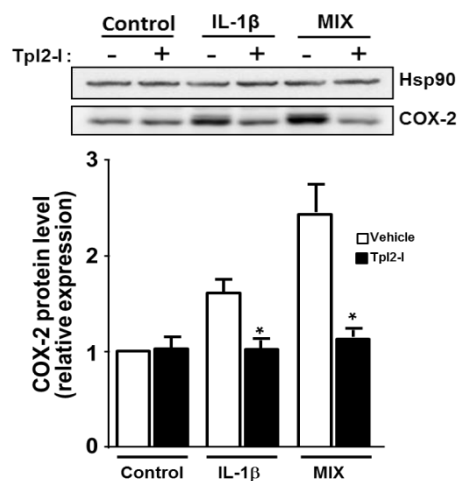
Figure 4: Tpl2 activity in adipocytes or in adipose tissue is required for LPS-induced COX-2 expression. (A) 3T3-L1 adipocytes incubated without (vehicle, DMSO) or with a Tpl2 inhibitor (Tpl2-I, 5 μ M) were exposed for 24 h with conditioned medium (CM) from RAW macrophages treated with LPS (0.5 ng/ml) or with cultured medium containing the same concentration of LPS (control medium, Ctrl). COX-2 mRNA expression was measured by real-time PCR. The mRNA expression was normalized using mouse *Rplp0* mRNA level and expressed in arbitrary units with the value in the control medium taken as 1. Data are presented as means \pm SEM of 4 independent experiments. (B) Western blot analysis of COX-2 expression with Hsp90 as loading control in the same experimental conditions as in (A). Representative immunoblots are presented. (C) Adipose tissue explants from wild-type (WT, n=4)) and Tpl2 knockout mice (Tpl2 KO, n=4) were incubated with LPS (100 ng/ml) for 24 h before measurement of COX-2 mRNA expression. Data are presented as means \pm SEM.

Figure 1

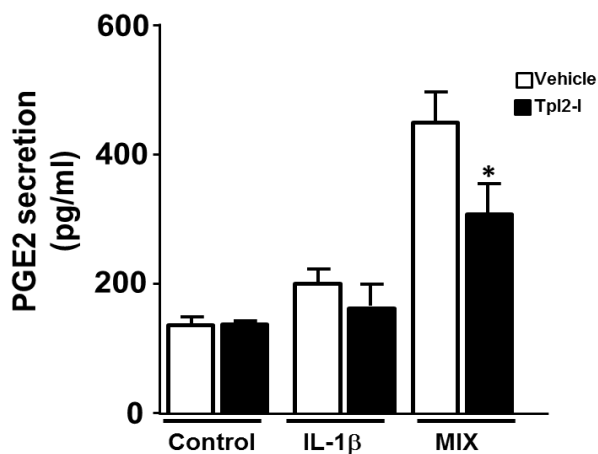
A



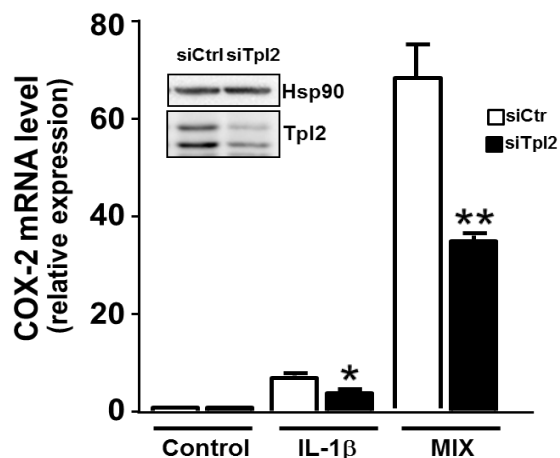
B



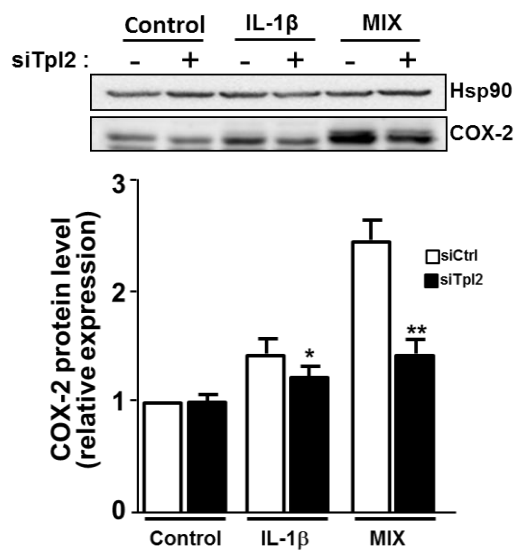
C



D



E



F

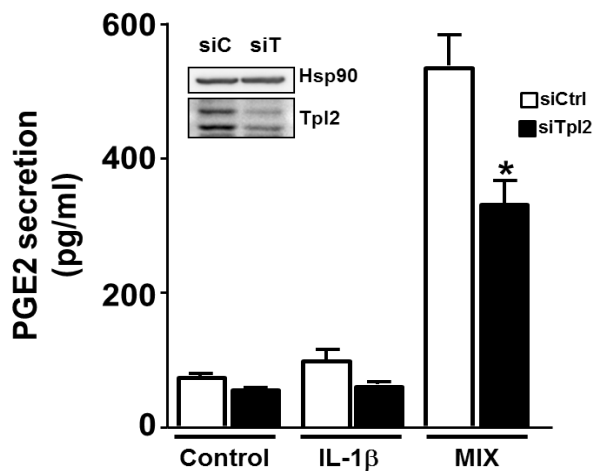
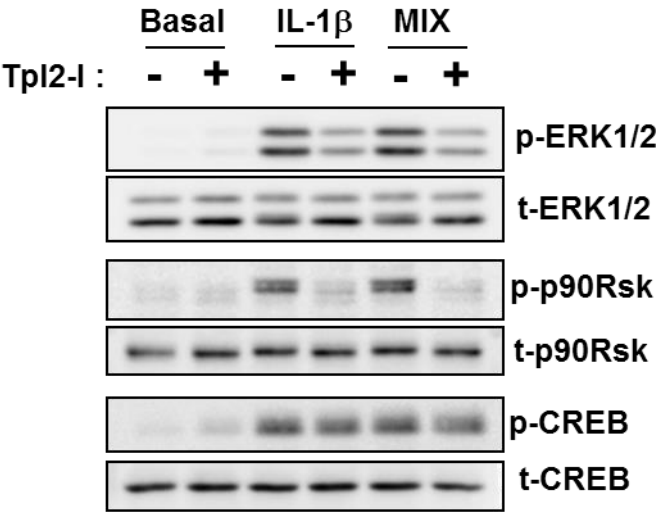
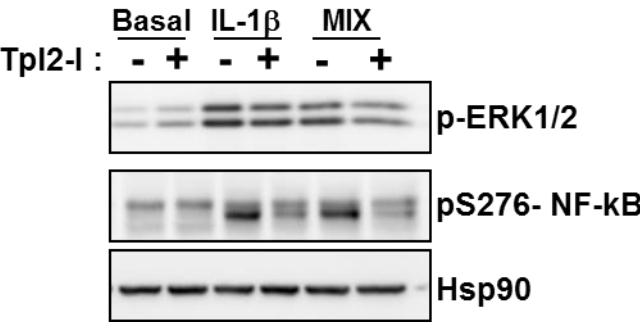


Figure 2

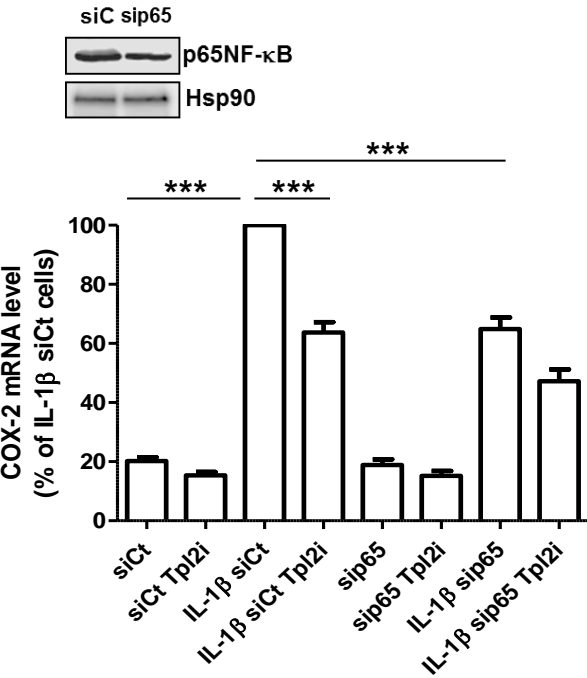
A



B



C



D

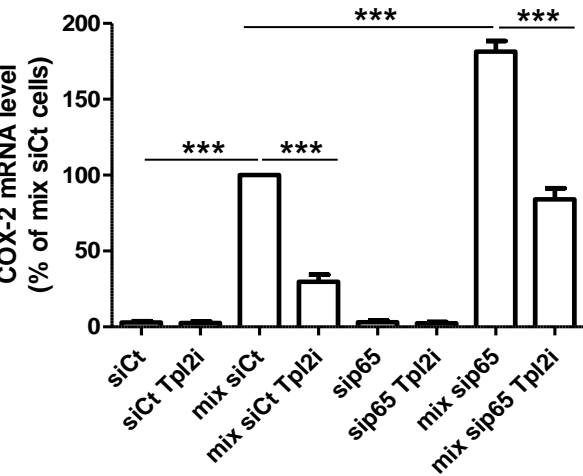
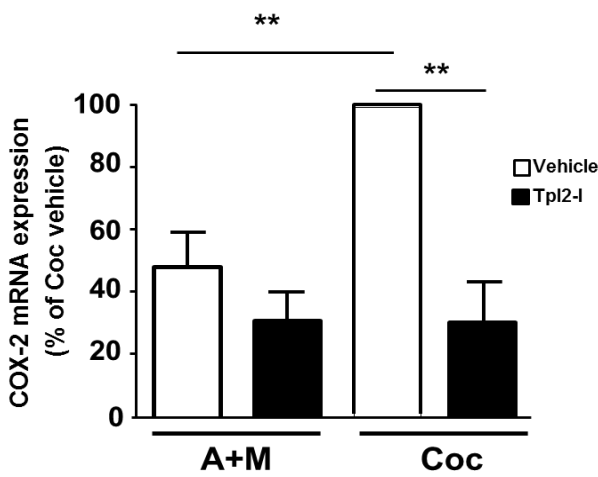
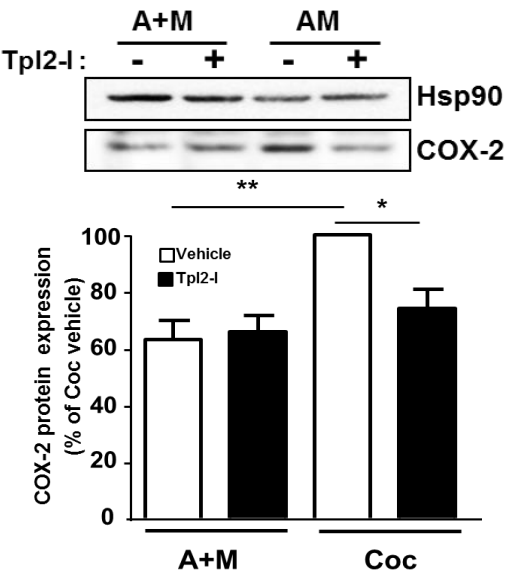


Figure 3

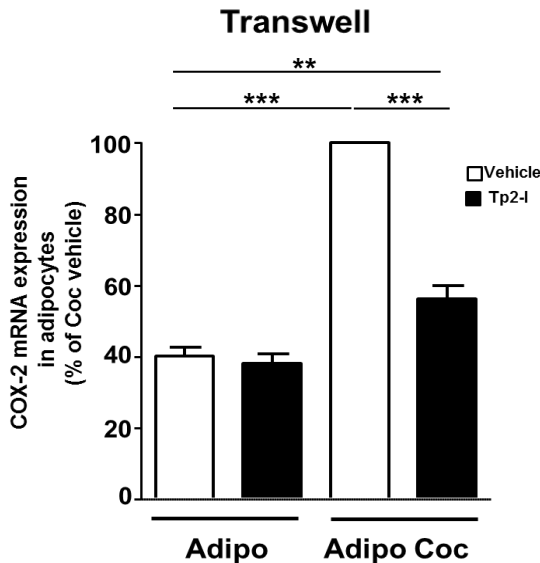
A



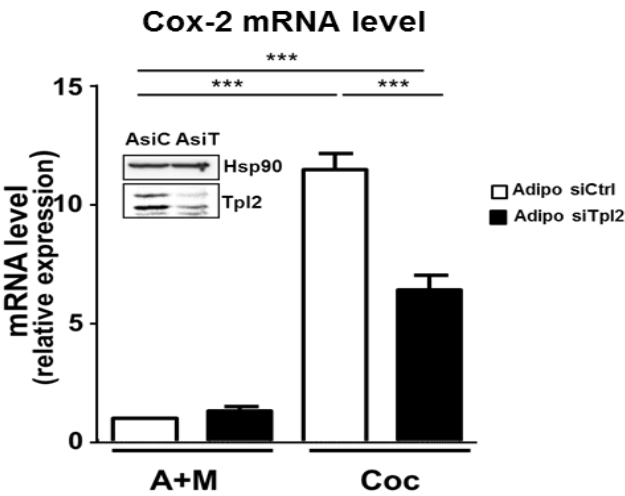
B



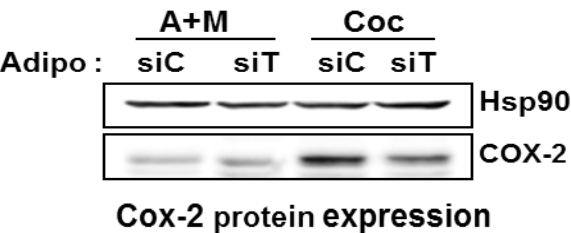
C



D



E



F

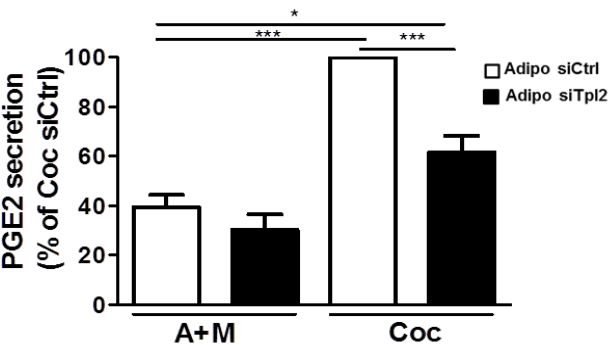
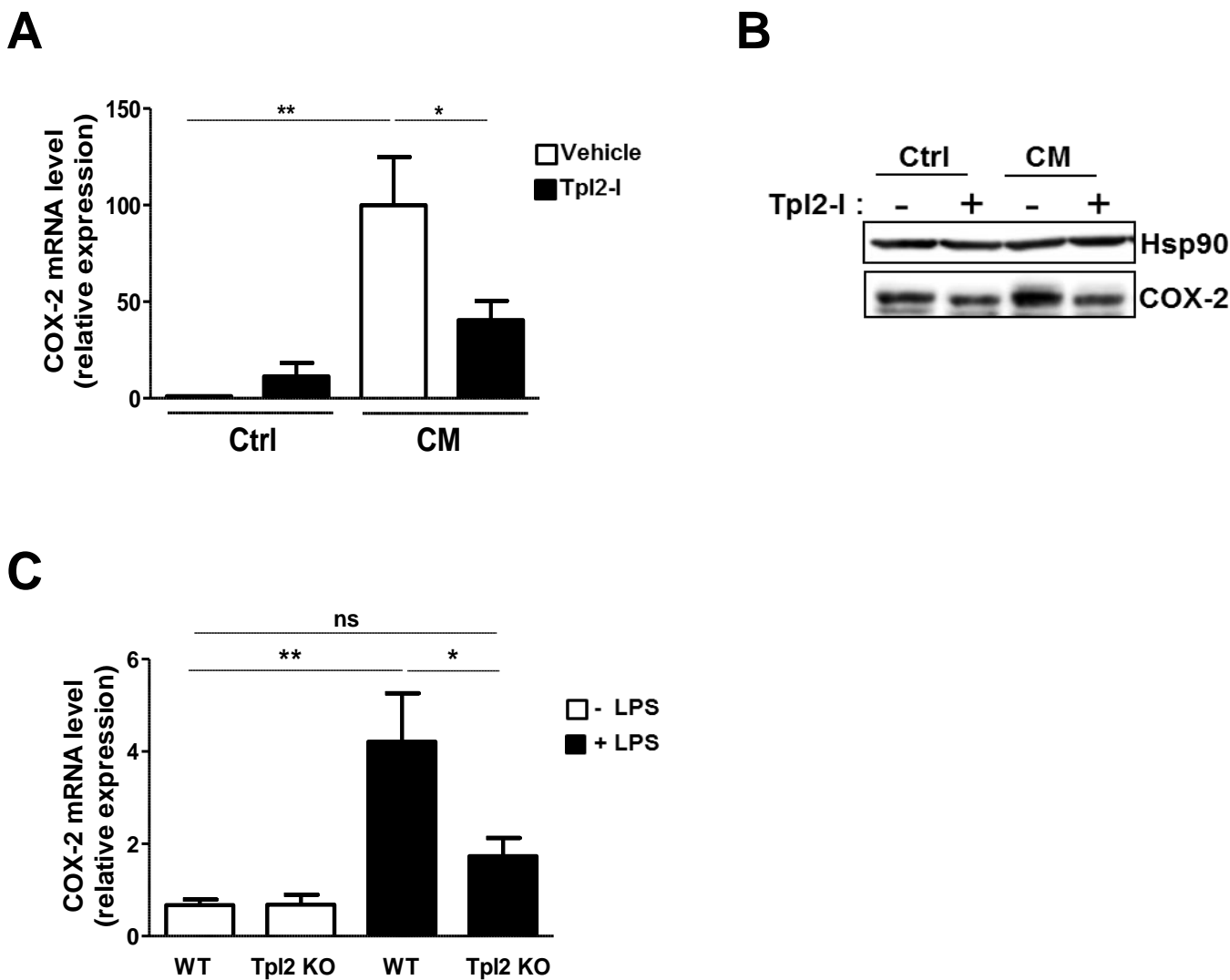


Figure 4



Article n°3

A small-molecule inhibitor of the MAP3 Kinase Tpl2 protects against diabetic-related pancreatic β -cell dysfunction and death

Varin E*, Muller D*, Broca C., Ravier M., **Ceppo F.**, Renard E., Wojtusciszyn A., Tanti JF**., and Dalle S**

Article en cours de soumission à Nature Communication

Objectifs

En fonction du stimulus, l'activation des kinases ERK 1/2 n'exerce pas les mêmes effets sur la cellule. En effet, dans les cellules β , les kinases ERK 1/2 sont impliquées dans les effets bénéfiques du glucose et du GLP-1, mais participent aux effets délétères de l'IL-1 β . Nous avons donc recherché une kinase qui pourrait gouverner l'activation des kinases ERK 1/2 spécifiquement en réponse aux cytokines inflammatoires dans les cellules β pancréatiques. Dans de nombreux types cellulaires la MAP3K Tpl2 est décrite pour activer les kinases ERK 1/2 spécifiquement en réponse à des stimuli inflammatoires. Suivant les cellules Tpl2 est potentiellement capable de participer à l'activation des kinases JNK et p38.

A l'heure actuelle, aucune donnée de la littérature ne précise ni l'expression ni le rôle de la protéine Tpl2, que ce soit dans les cellules β pancréatiques, les îlots murins ou les îlots humains. Notre hypothèse est que cette kinase pourrait être ciblée pour limiter la perte de fonction et la mort des cellules β pancréatiques observées en présence de cytokines pro-inflammatoires à proximité des îlots de Langerhans.

Résultats

Tpl2 est exprimé dans la lignée cellulaire INS-1E ainsi que dans les îlots murins et humains (Figure 1). Dans les cellules β les cytokines induisent l'activation de Tpl2 comme l'indique sa dégradation (Figure 2). Tpl2 participe à l'activation des kinases ERK en réponse aux cytokines sans participer à leur activation en réponse au glucose, mais n'est pas impliqué dans l'activation des kinases JNK et p38 (Figure 2). La longue stimulation (24 à 48h) des cellules β par les cytokines induit une mort cellulaire par apoptose qui est partiellement inhibée lors de l'inhibition pharmacologique de Tpl2 (Figure 3). Des résultats similaires sont obtenus lors de l'utilisation d'îlots de souris isolés. La courte stimulation d'îlots pancréatiques humains avec les cytokines pro-inflammatoires induit l'activation des kinases ERK au travers de l'activation de Tpl2. Une longue stimulation de ces îlots avec les cytokines induit une apoptose et une diminution de la sécrétion d'insuline, ces deux effets délétères sont partiellement reversés lors de l'inhibition de Tpl2 (Figure 4).

Le traitement de souris obèses diabétiques (*db/db*) avec l'inhibiteur de Tpl2 permet de prévenir le développement de l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie, ce qui est associé à une amélioration de la sensibilité à l'insuline de ces souris (Figure 6).

Conclusion

Ces résultats indiquent que Tpl2 pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans la protection des cellules β pancréatiques vis-à-vis de la mort cellulaire et l'altération de la sécrétion de l'insuline induites par les cytokines. L'inhibition de Tpl2 *in vivo* dans des souris obèses diabétiques permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline de ces souris et de diminuer l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie.

Tpl2 inhibition prevents diabetic-related β -cell dysfunction and death

Elodie M. Varin^{1,2,3,4,5,*}, Dany Muller^{1,2,3,*}, Christophe Broca⁴, Magalie A. Ravier^{1,2,3}, Franck Ceppo^{6,7}, Eric Renard^{1,2,3,4,8}, Anne Wojtuszczyk^{1,2,3,4,8}, Jean-François Tanti^{6,7,**}, and Stéphane Dalle^{1,2,3,4*,**}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U661, Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF), F-34000 Montpellier, France,

²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche (UMR)-5203, F-34000 Montpellier, France,

³Universités de Montpellier 1 et 2, F-34000 Montpellier, France,

⁴Laboratoire de Thérapie Cellulaire du Diabète (LTCD), Institut de Recherche en Biothérapie (IRB), Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, F-34295 Montpellier, France,

⁵Department of Medicine, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mt Sinai Hospital, Toronto, Ontario Canada M5G 1X5

⁶INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Team 7, F-06204 Nice, France,

⁷Université de Nice Sophia-Antipolis, Faculté de Médecine, F-06204 Nice, France,

⁸Département d'Endocrinologie, Diabète, et Nutrition, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, F-34000 Montpellier, France.

* These authors contributed equally to this work

** Correspondence should be addressed to S.D. (stephane.dalle@igf.cnrs.fr) or J.-F.T.

(tanti@unice.fr)

Conflict of interest: We certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript.

Abstract

Beside genetic determinants and gluco- and lipo-toxicity, chronic inflammation is considered a hallmark of type 2 diabetes, attenuating insulin action and affecting both β -cell function and mass. The MAP3 Kinase 8, Tumor progression locus 2 (Tpl2), plays an important role in the regulation of inflammatory response but its involvement in cytokine-induced β -cell dysfunction is unknown. Here, we report Tpl2 expression in clonal β -cells, mouse and human pancreatic islets, and Tpl2 over-expression in islets of diabetic rats. Proinflammatory cytokines increase Tpl2 expression in β -cells and human islets. Pharmacological inhibition of Tpl2 specifically blocks cytokine-induced ERK1/2 activation, prevents apoptosis and detrimental effects of cytokines on glucose-stimulated insulin secretion in both β -cells, mouse and human pancreatic islets. The preservation of glucose-stimulated insulin secretion index in islets exposed to cytokines and treated with Tpl2 inhibitor was mainly due to the restoration of intracellular calcium concentration increase. Intra-peritoneal administration of a Tpl2 inhibitor significantly reduced fasting hyperglycemia, and hyperinsulinemia, and improved glucose tolerance in diabetic mice. Our results identify Tpl2 as a new key actor in a β -cell inflammatory signaling process leading to β -cell alteration, and Tpl2 inhibition as a potential therapeutic strategy to prevent β -cell dysfunction and apoptosis, and to treat type 2 diabetes.

Introduction

It is now widely accepted that, in addition to insulin resistance, a major insulin secretory deficiency, associated with a reduced level of pancreatic β -cell survival, play essential roles, in the development of type 2 diabetes (T2D) (1). Beside genetic determinants and gluco- and lipo-toxicity, chronic inflammation is considered a hallmark of T2D (2), attenuating insulin action (3) and affecting both insulin secretion and β -cell survival (4, 5). Macrophages infiltration and increased levels of chemokines and proinflammatory cytokines such as Interleukin-1 β (IL-1 β) and Tumor Necrosis Factor α (TNF α) have been observed in pancreatic islets of rodent models of diabetes (6–8) and T2D patients (6, 9), and in rodent and human islets exposed to metabolic stressors such as high levels of glucose and/or palmitate (6, 10). Several studies suggest that inflammatory cytokines and chemokines produced by macrophages and/or β -cells (11) residing in the islets, contribute to both β -cell dysfunction and death, leading to insulin secretory defects in diabetic conditions (6, 12), making islet inflammation an important determinant in the progression of T2D. Immune-modulatory strategies for the treatment of T2D have emerged (13, 14), and mild reductions in hyperglycemia and improvements in β -cell function were observed in T2D patients treated with the IL-1 β receptor antagonist IL-1RA (14). This study was the first proof of concept for the use of immune-modulatory strategies in T2D.

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) (i.e. ERK1/2, c-Jun N-terminal Kinase (JNK), and p38) play important roles in cytokine-induced β -cell dysfunction and death (15). Specifically, activation of ERK1/2 by IL-1 β mediates β -cell insulin secretion impairment and apoptosis (16–18). The serine/threonine kinase tumor progression locus 2 (Tpl2) (also known as Cot, Cancer Osaka thyroid) is a mitogen-activated protein kinase kinase kinase (the MAP3K8). It is the only MAP3K able to activate the ERK1/2 pathway in response to inflammatory stimuli, and can also be involved in JNK and p38MAPK activation in some cell types (19, 20). These kinases play an important role in macrophage activation, and in the production and intracellular effects of chemokines/cytokines,

including IL-1 β and TNF- α (21–23). Dysregulation of the Tpl2-ERK1/2 pathway is associated with acute or chronic inflammatory diseases (22, 23). Studies reported increased Tpl2 expression levels in adipose tissue from obese/diabetic rodents and obese patients, implicating a potential role for this kinase in inflammation-induced insulin resistance (21, 22, 24). However, it is still unknown whether Tpl2 regulates inflammatory signaling pathways in β -cells and impacts their function and survival.

Here, we report that Tpl2 is expressed in clonal β -cells, and rodent and human islets, and that its expression levels are increased in islets from diabetic rats, or in response to IL-1 β , alone or in combination with TNF α and IFN γ . *In vitro*, pharmacological inhibition of Tpl2 specifically blocks ERK1/2 activation induced by acute cytokine stimulation, and prevents the detrimental effects of chronic cytokine exposure on survival and function of β -cells, and mouse and human islets. *In vivo*, Tpl2 inhibition improved fasting hyperglycemia, insulinemia, glucose tolerance, and insulin sensitivity in diabetic *db/db* mice. Our results suggest that Tpl2 is part of a β -cell inflammatory signaling process that leads to β -cell alteration. Tpl2 inhibitors may offer a strategy to alleviate inflammation-induced β -cell dysfunction and death in T2D.

Results

Tpl2 is expressed in β -cells, rat and human pancreatic islets and up-regulated by proinflammatory cytokines

Using protein lysates from the β -clonal cell line INS-1E, and rat and human islets, we detected two bands of 58 and 52 kDa (Figure 1A), corresponding to the long (Tpl2_L) and the short (Tpl2_S) isoforms of Tpl2, consistent with what has been reported in other cell types (25). Compared to other tissues such as macrophages, Tpl2_L was expressed at a higher level relative to Tpl2_S in β -cells and islets (Figure 1A). Notably, we observed significant 2- and 2.5-fold increases in Tpl2_L and Tpl2_S protein expression respectively, in islets isolated from diabetic GK rats, compared to control non diabetic Wistar rats (Figure 1B). The GK rat is one of the best characterized animal models of spontaneous T2D (26), and their age in this study (8 to 10 weeks) correlates with the onset of hyperglycemia, inflammatory macrophage infiltration and increased expression of several inflammatory markers including IL-1 β in islet tissue (7–9). We then mimicked inflammation by a chronic treatment of INS-1E cells or human islets with the inflammatory cytokine IL-1 β or a mixture of proinflammatory cytokines (CK; IL-1 β , TNF α , and IFN γ). Treatment with IL-1 β or the cytokine mix increased expression of both Tpl2_L and Tpl2_S by 3- and 4-fold respectively, in INS-1E cells (Figure 1C,D), and by 1.5- and 2-fold in human islets (Figure 1E).

Tpl2 mediates cytokine-induced ERK1/2 and p90RSK activation

Tpl2 activation requires inducible phosphorylation by several upstream kinases including IKK β and Akt (27, 28). Western blot analyses revealed an up-shift in Tpl2_L band mobility, likely indicative of Tpl2_L phosphorylation and activation upon acute stimulation (5 to 10 min) of β -cells with IL-1 β or the cytokine mix (Figure 2A,B). In unstimulated cells, Tpl2 is stabilized and inactivated by association with NF- κ B1 precursor protein p105 (29). Inflammatory stimulation activates the IKK β kinase which phosphorylates p105 and triggers its proteasomal degradation. This releases Tpl2

from p105 inhibition, and enables Tpl2 to access its substrates, including MEK1/2 (29, 30). Following phosphorylation and activation, Tpl2 was shown to be rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system (22, 29, 30). In accordance with these data, we showed that Tpl2_L protein expression is significantly decreased after 20 min of cytokine stimulation, and for at least 30 min (Figure 2A,B). Notably, Tpl2_L isoform was also preferentially phosphorylated and degraded (Figure 2A,B).

We investigated whether Tpl2 was required for cytokine-induced MAP kinase activation in β -cells. To this end, we used a relatively low concentration (3 μ M) of a potent reversible-, and ATP-competitive Tpl2 inhibitor that displays significant selectivity over other related kinases (22, 31). Tpl2 inhibition suppressed \sim 60% of IL-1 β -induced ERK1/2 phosphorylation in INS-1E cells, indicating that Tpl2 activation is important for IL-1 β -stimulated phosphorylation of ERK1/2 in β -cells (Figure 2C). Downstream of ERK1/2, p90 ribosomal S6 kinase (p90RSK) phosphorylation was inhibited to the same extent following Tpl2 inhibition (Figure 2C). Similar results were observed when IFN γ and TNF α were combined with IL-1 β (Figure 2D). In contrast, the Tpl2 inhibitor had no effect on IL-1 β -induced p46/p54 c-Jun N-terminal kinases (JNK) or p38MAPK phosphorylation (Figure 2E). Inhibition of these kinases was not observed even at a higher concentration of the inhibitor (See Supplementary Figure 1A). Neither glucose-induced ERK1/2 nor p90RSK phosphorylation, reported to play a key role in glucose-mediated β -cell survival (32), were modified by Tpl2 inhibition (Figure 2F), suggesting a Tpl2 involvement in ERK1/2 activation specifically in response to an inflammatory stimulus. Additionally, in contrast to stimulation by IL-1 β or cytokines, glucose did not modify total Tpl2 protein expression (see Supplementary Figure 1C vs 1B), indicating that glucose is unlikely to activate Tpl2 in β -cells. As a control of efficacy and specificity of the Tpl2 inhibitor used, a 30-50% decrease of expression of both forms of Tpl2 by siRNA reduces by about 50% the phosphorylation of ERK1/2, but does not affect the phosphorylation of p38MAPK induced by cytokines (see Supplementary Figure 2A-B). Phosphorylation of ERK1/2

induced by an acute stimulation with glucose is not affected by Tpl2-siRNA (see Supplementary Figure 2C).

Tpl2 inhibition reduces cytokine-induced apoptosis in INS-1E cells

Whether Tpl2 inhibition could protect β -cells from cytokine-induced apoptosis was investigated by measuring levels of cleaved forms of caspase-3 and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), two key executioners and markers of apoptosis (33). Exposure to IL-1 β for a minimum of 24 h led to significant apoptosis in INS-1E cells (see supplemental Figure 3A and Figure 3A). The levels of both cleaved caspase-3 and cleaved PARP, induced by 48 h of IL-1 β , were decreased (45 and 30%, respectively) in INS-1E cells treated with the Tpl2 inhibitor (Figure 3A). Consistent with previous observations (34, 35), the level of cleaved caspase-3 was dramatically increased by the cytokine mix compared to the levels induced by each cytokine alone (see supplemental Figure 3B,C and Figure 3B). Even under these heightened apoptotic conditions and after only 24 h, Tpl2 inhibition decreased both cleaved caspase-3 and cleaved PARP levels in INS-1E cells (30 and 25%, respectively) (Figure 3B).

To determine whether Tpl2 inhibition could protect β -cells from apoptosis induced by a more physiological cocktail of cytokines, we used a conditioned medium from LPS-activated RAW264.7 macrophages. This medium contains several cytokines and chemokines secreted by activated macrophages, including interleukins (IL-6, IL-8, IL-1 β) and TNF α (36). Cleavage of caspase-3 was induced in INS-1E cells treated for 24 h with the conditioned medium, whereas pharmacological inhibition of Tpl2 decreased the level of cleaved caspase-3 by about 55% (Figure 3C). Notably, 24 to 48 h treatment of INS-1E cells in the presence of Tpl2 inhibitor alone at 3 μ M did not increase INS-1E cell apoptosis (Figure 3A-C).

Tpl2 inhibition reduces ERK1/2 activation and the deleterious effects of inflammatory cytokines in mouse islets

Treatment of mouse islets with the Tpl2 inhibitor (3 μ M) was associated with near total inhibition of ERK1/2 and p90RSK phosphorylation induced by an acute stimulation with cytokines (Figure 4A), as well as an approximately 50% reduction in apoptosis induced by a prolonged exposure to cytokines (Figure 4B). These results correlated with total cell death as measured by DNA fragmentation (Figure 4C). In contrast, 24 h treatment of mouse islets with Tpl2 inhibitor alone had no effect on the apoptotic death (Figure 4B,C).

Cytokines are known to synergistically act, not only to reduce survival but also to alter insulin secretion (4, 37, 38). Here, exposure of mouse islets to cytokines for 24 h severely impaired insulin secretion (Figure 4D), and changes in free cytosolic calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_c$) (Figure 4E vs 4F). Indeed, cytokines increased basal insulin secretion (Figure 4D) and $[Ca^{2+}]_c$ (Figure 4E vs 4F), and markedly blunted the effect of glucose on both insulin secretion and $[Ca^{2+}]_c$ changes (Figure 4D-F). Tpl2 inhibitor treatment of islets exposed to cytokines for 24 h restored GSIS (Glucose-Stimulated Insulin Secretion) (Figure 4D) and increased $[Ca^{2+}]_c$ influx (Figure 4F, and see supplementary Table 1), without modifying cytokine-induced elevated basal insulin secretion (Figure 4D) and $[Ca^{2+}]_c$ (Figure 4F). This effect of glucose on insulin secretion is mainly due to the restoration of $[Ca^{2+}]_c$ influx, as shown by the strong correlation between both parameters (Figure 4G).

Tpl2 inhibition protects human islets from cytokine-induced β -cell death and defects in insulin secretion

We next examine if inactivation of Tpl2 could prevent cytokine-induced apoptosis and defective insulin secretion in human islets. We first confirmed that treatment of human islets with Tpl2 inhibitor could efficiently inhibit ERK1/2 phosphorylation induced by the cytokine mix (Figure 5A). The death of human islet cells induced by cytokines was modestly but significantly decreased by

Tpl2 inactivation (Figure 5B), whereas treatment of human islets with Tpl2 inhibitor alone did not modify survival (Figure 5B). As observed after 24 h in mouse islets, a 72 h exposure of human islets to cytokines severely deteriorated insulin secretion by increasing basal insulin secretion and by blocking the ability of glucose to further stimulate insulin secretion (Figure 5C). Treatment of human islets with Tpl2 inhibitor significantly restored GSIS without modifying the elevated basal insulin secretion (Figure 5C).

Tpl2 inhibition reduces the development of hyperglycemia and hyperinsulinaemia in *db/db* mice

To assess the potential for Tpl2 inhibitor to prevent or delay the progression of diabetes, we randomized 6-week-old *db/db* mice into two groups: one group (*db/db*-Tpl2-I) received daily intraperitoneal (*i.p.*) injection of the Tpl2 inhibitor (2.5 mg per kg) for 14 days and the other group (*db/db*-vehicle), as well as 6-weeks-old *db/+* mice (*db/+*-vehicle), received injection of vehicle. As expected, before treatment, initial body weight and fasting serum insulin levels were significantly higher in the two groups of *db/db* mice as compared with *db/+* mice (Figure 6A,B) and the *db/db* mice were markedly glucose intolerant (Figure 6C). Importantly, indicative of a correct randomization, body weight, fasting insulin and glucose levels were similar between the two groups of *db/db* mice before treatment (Figure 6A-C). Interestingly, *db/db* mice treated with Tpl2 inhibitor had improved glucose tolerance after only 7 days of treatment, with an approximate 20-30% reduction in the area under the curve (Figure 6D), although significant improvement in fasting glucose were not yet apparent at this time point (Figure 6E). However, after 14 days, Tpl2 inhibitor treatment improved metabolic parameters in *db/db* mice, with a decrease in both fasting blood glucose (from 258.6 ± 40.7 to 144.0 ± 15.5 mg/dL) (Figure 6F) and fasting serum insulin levels (from 11.3 ± 1.2 to 4.3 ± 0.4 ng/ml) (Figure 6G), suggesting improved insulin sensitivity. Insulin tolerance testing revealed that Tpl2 inhibitor treatment indeed significantly improved insulin sensitivity in *db/db* mice (Figure 6H). Vehicle-administered *db/db* mice showed significantly lower

insulin-dependent reductions in blood glucose (Figure 6H), which is consistent with the development of insulin resistance in *db/db* mice (39).

Body weight increases in all groups after 2 weeks of treatment (Figure 6A vs 6I) were more pronounced in *db/db* mice compared to *db/+* animals (Figure 6I). Importantly, vehicle- and Tpl2 kinase inhibitor-treated *db/db* mice showed similar body weight gain throughout the experiments with no significant difference in their body weight at the end of the treatment period (Figure 6I). These data suggest that *i.p.* administration of 2.5 mg per kg Tpl2 kinase inhibitor during the 14 days of investigation was not associated with any adverse or toxic effects, and that the improvement in metabolic variables was not a consequence of weight loss.

Discussion

Identification of proteins that regulate signaling pathways specifically in response to cytokines may provide important new insights into the molecular mechanisms that promote β -cell impairment, and represent potential new targets in the treatment of diabetes and related disorders. We hypothesized that one such candidate could be the MAP3K Tpl2, known to regulate selectively MAP kinases downstream of innate immunoreceptors (20, 22).

In β -cells, and rodent and human islets, although both Tpl2 isoforms were expressed, Tpl2_L was the predominant isoform degraded by IL-1 β and a cytokine mix (IL-1 β , TNF α , and IFN γ) in comparison to Tpl2_S. These observations are in agreement with previous studies performed in immune cells (39), and support an activation of Tpl2. Indeed, Tpl2_L degradation only, through a proteasome dependent process, was shown to be tightly coupled to its activation in macrophages (29, 30). Activation of Tpl2 was reported to be implicated in phosphorylation of ERK1/2 and JNK in MEF cells (19, 39), and of ERK1/2 and p38MAPK in macrophages stimulated by TNF α (19). We show in β -cells that Tpl2 is involved in ERK1/2 but not in JNK or p38 MAP kinases activation in response to cytokines, in agreement with what has been observed in macrophages in response to IL-1 β (23), or in adipocytes in response to IL-1 β and TNF α (22).

In line with the fact that ERK1/2 activation was shown to mediate the detrimental effects of IL-1 β on β -cells (16–18), Tpl2 inactivation decreased apoptosis induced not only by IL-1 β but also by a cocktail of synergistic cytokines, and by cytokines secreted by LPS-activated macrophages. Chronic exposure of β -cells to cytokines was found to exert adverse effects on insulin secretion and $[Ca^{2+}]_c$ changes, as described (4, 40, 41). Inactivation of Tpl2 preserved the capacity of glucose to stimulate insulin secretion and to increase $[Ca^{2+}]_c$ in β -cells exposed to cytokines. Hence, Tpl2 inactivation may, at least in part, favor the maintenance of efficient glucose sensing and/or metabolism (42, 43).

We found that, *in vivo*, diabetes was associated with increased Tpl2 protein expression in pancreatic islets of GK rats. A long term exposure of INS-1E to IL-1 β or to cytokines increased Tpl2 protein expression in β -cells and in human islets *in vitro*. Hence, cytokines linked to T2D could promote both the activation of Tpl2, coupled to its rapid degradation, and induce its overexpression in β -cells with prolonged exposure. Although activation of Tpl2 is implicated in cytokine-induced β -cell apoptosis, overexpression could also be implicated in apoptosis, as in other cell types (44, 45). As induction of Tpl2 by TNF α in adipocytes enhances ERK1/2 phosphorylation/activation induced by acute IL-1 β stimulation (22), Tpl2 overexpression could also favor signaling pathways that are activated by acute cytokine stimulations in β -cells.

Based on studies using Tpl2 knockout mice, Tpl2 has been regarded as a promising therapeutic target for improving the metabolic state associated with obesity, and particularly for restoring insulin sensitivity and reducing lipolysis in adipocytes (22, 24). However, the therapeutic potential of Tpl2 has been challenged by two other studies that found no improvement in obesity-associated metabolic disorders in Tpl2 knockout mice (46, 47), despite a decrease in adipose tissue inflammatory markers (47). Differences in experimental conditions, such as the type of high-fat diet or the age of the mice, could explain these contradictory results. Further, it is known that alterations in microbiota composition contribute to metabolic diseases and differences in microbiota between facilities may also explain these disparate findings (48). Differences in the metabolic adaptations of the knockout mice may also contribute to these discrepancies. Here, we report that administration of a Tpl2 kinase inhibitor to *db/db* mice significantly corrects the glucose intolerance already after 7 days of treatment, and that notable and significant effects of Tpl2-I against hyperglycemia and hyperinsulinemia are only observed 14 days after the first injection. These effects are likely attributed to preservation of β -cell function, and slight but significant improvement in insulin sensitivity. These effects are comparable to what is observed with established insulin sensitizing drugs such as thiazolidinediones, suggesting that the Tpl2 inhibitor may be an insulin

sensitizer. Consistent with this hypothesis, Tpl2 was reported to play a key role in modulating insulin sensitivity in adipocytes (22, 24). In addition, we found that the deleterious effects of inflammation on β -cell function and survival are attenuated *in vitro* by addition of Tpl2 inhibitor. Whether the potential beneficial *in vivo* effect of the Tpl2 inhibitor on β -cell function resulted from reduced pancreatic islet inflammation and/or lower demand for insulin due to increased insulin sensitivity remain to be completely elucidated.

Collectively, our results provide important new insights into the molecular mechanisms that promote β -cell dysfunction, and suggest that Tpl2 inhibition could be used as a therapeutic approach to alleviate β -cell failure, which is a common feature of T2D. Targeting Tpl2 could also represent a strategy with potential therapeutic benefit in pancreatic islet transplantation procedures, by preventing the instant blood-mediated inflammatory reaction, implicating proinflammatory cytokines including IL-1 β , TNF α and IFN γ (49, 50). As Tpl2 inhibitors are currently developed by pharmaceutical industries for treating inflammatory diseases (51, 52), our results reinforce the need to expand the clinical evaluation of this drugs to include patients with T2D and related metabolic disorders.

Methods

Materials and reagents. Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) culture media, Fetal Bovin Serum (FBS), Human recombinant IL-1 β and TNF α , and human and rat recombinant IFN γ were purchased from Invitrogen (Life Technologies SAS, France). Murine IL-1 β and TNF α were purchased from PreProtech (Neuilly, France). Tpl2 kinase inhibitor [4-(3-Chloro-4-fluorophenylamino)-6-(pyridine-3-yl-methylamino)-3-cyano-[1,7]-naphthyridine] was obtained from Calbiochem (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). This inhibitor is known to display significant selectivity over other related kinases such as MEK, MK2, Src, protein kinase C, EGF receptor and p38MAPK, only at concentrations higher than 5 μ M (<http://www.millipore.com/catalogue/item/616373-1mg>). Nitrocellulose transfer membranes (Protran) and chromatography paper were obtained from Schleicher & Schuell (Dassel, Germany). High performance chemiluminescence films were purchased from Amersham (GE Healthcare limited, Buckinghamshire, UK). Bicinchoninic acid (BCA) and Copper (II) sulfate solutions, and Histopaque® 1077 were from Sigma (St. Louis, MO). Enhanced chemiluminescence reagents were from Santa Cruz Biotechnology and Perkin Elmer.

Antibodies. Anti-Tpl2 (ref: SC-720) and HRP-linked anti-mouse IgG (ref: SC-2005) antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Antibodies against cleaved caspase-3 (ref: 9661), cleaved and total PARP (ref: 9542), total p38 MAPK (ref: 9212), total SAPK/JNK (ref: 9252), phospho-p90rsk (Thr573) (ref: 9346), phospho ERK1/2 (p44 and p42 MAPK) (Thr202/Tyr204) (ref: 9106), phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (ref: 9215, 4511), phospho-SAPK/JNK (p46 and p54 SAPK/JNK) (Thr183/Tyr185) (ref: 9251) and horseradish peroxidase (HRP)-linked anti-rabbit IgG (ref: 7074) were obtained from Cell Signaling Technology (New England Biolabs, Beverly, MA). Anti-Hsp90 antibody (ref: 05-594) was from UpState Biotechnology (Millipore, Billerica, MA, USA). Anti-ERK1/2 antibody (ref: 610030) was obtained from Transduction

Laboratories (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), and anti- β -actin antibody (ref: A-5441) was obtained from Sigma (St. Louis, MO).

Culture of INS-1E Cells and RAW264.7 macrophages. The rat β -cell line INS-1E was provided by Pr. Maechler (Department of Cell Physiology and Metabolism, Faculty of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland) (53). This insulinoma cell line (passages 60-95) was maintained in culture at 37° C using RPMI 1640 medium containing 11.1 mM glucose and 7.5% (vol. / vol) FBS, as described (53, 54). RAW264.7 (thereafter referred as RAW) macrophages were maintained in DMEM containing 5% (vol. / vol.) heat-inactivated FBS and antibiotics at 37° C and 5% CO₂/95% air atmosphere.

RNA interference. In RNA interference experiments, Tpl2 expression was specifically silenced in INS-1E cells using a validated set of 4 different 19-nucleotides siRNA duplexes (“ON-TARGETplus SMARTpool”, L-091828-01-0005) purchased from Dharmacon. Positive and negative controls were “ON-TARGETplus cyclophilin B control pool-rat” and “ON-TARGETplus Non-targeting pool-rat”, respectively (Dharmacon, ABgene Ltd, part of Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Briefly, groups of 500,000 INS-1E cells were maintained in culture in the absence of penicillin and streptomycin for 24 hours before being transfected with 40 nM siRNA-Lipofectamine™ 2000 complexes prepared in Opti-MEM medium at a 2:1 ratio. Six hours after transfection, the medium was replaced with fresh antibiotic-free RPMI medium supplemented with 7.5% FCS. A second transfection was performed 24 hours after the first one to improve the transfection efficiency. All assays were performed at least 50 h after the first transfection.

Animals. Male C57BL/6 mice were obtained from Charles River Laboratories (St. Aubin les Elbeuf, France). Diabetic GK (Goto-Kakizaki) rats were housed and obtained from the colony initiated by the team of Dr. C. Tourrel-Cuzin at the Adaptive and Functional Biology Unit (Paris DIDEROT

University, Paris, France) with progenitors issued from the original colony established by Goto and collaborators (55). Nondiabetic Wistar rats were used as control animals. *db/db* mice were obtained from Janvier Labs (France). All animals were maintained on a 12-h light, 12-h dark cycle and were provided free access to water and standard rodent diet.

Treatment of *db/db* mice. Experiments were carried out on 6-week-old *db/db* mice fed a standard diet (4% fat) throughout the study. The *db/db* mice were treated with daily intra-peritoneal (*ip*) administration of either the Tpl2 inhibitor (2.5 mg/kg) or vehicle (KRBS/DMSO initial 10% V/V) for 14 days. The final concentration of DMSO was estimated to 0.75% in blood circulation, a significant lower dose than previously described in rodent (56). As a control, *db/+* mice were treated under the same conditions with vehicle. Body weights were recorded until the day of sacrifice. Glucose tolerance tests were performed by *ip* administration of 1-2 g per kg body weight glucose after a 16 h overnight fast and blood glucose concentrations were determined with a glucometer (Verio Onetouch, Lifescan, Johnson and Johnson Company) using blood sampled from the tail vein. Insulin tolerance tests were carried out in a similar manner following the *ip* administration of 0.75 U insulin per kg body weight to non-fasted mice. Plasma insulin levels were quantified by radioimmunoassay (RIA rat insulin kit, Millipore, Germany) using blood sampled from the tail vein on the first day of the study or from jugular arteries the day of the sacrifice.

Pancreatic Islet Isolation and Culture. Pancreatic islets were isolated from male 5- to 6-month-old (for long term experiments) or 10- to 12-weeks-old (for short term experiments) C57BL/6 mice following the injection of approximately 2 ml of 1 mg/ml collagenase XI through the bile duct. The pancreata were then removed, incubated at 37°C with agitation for 9 minutes to complete the digestion and the islets were separated from the exocrine pancreatic tissue using a histopaque-1077 gradient. The islets were then washed in cold PBS supplemented with 1.2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and 5.6 mmol/L glucose, handpicked under a dissecting microscope, separated into groups

composed of 200-300 islets and maintained in culture at 37°C (95% air and 5% CO₂) in RPMI 1640 (11 mmol/L glucose) supplemented with 10% FBS, 2 mmol/L glutamine, 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin for at least 24 hours before being used. Islets from 8-10 week-old male Wistar and GK rats were isolated at the Adaptive and Functional Biology unit (Paris DIDEROT university, Paris, France), as described (57). Groups of 300-500 Wistar or GK islets were stored at -80°C until studied. Human pancreata were harvested from five brain-dead non-obese non-diabetic donors in agreement with the French Agence de la Biomedecine and the local Institutional Ethical Committee. Human islets were isolated at the Diabetes Cellular Therapy Laboratory (Institute for Research in Biotherapy, Montpellier, France) or at the Cell Isolation and Transplantation Center (University of Geneva, Geneva, Switzerland) according to a slightly modified version of the automated method (58, 59). Islets were cultured for recovery during 1 to 5 days after isolation in CMRL 1066 (Mediatech, Herndon, VA) medium containing 5.6 mmol/L of glucose and supplemented with 10% FBS, 100 UI/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 2 mM glutamine.

Drug exposure. To determine the effects of Tpl2 on kinase phosphorylation during an acute stimulation with cytokines, short term experiments (20 min) were performed in Krebs-Ringer Bicarbonate (KRB) buffer without glucose for INS-1E, and containing 1.1 and 4 mmol/l glucose for mouse and human islets, respectively (see compositions in (53, 54)). INS-1E cells (~70% confluence in 6-well plates), mouse islets (200-300 per condition in 1.5ml eppendorf), or human islets (500-1000 IEQ per condition in 12-well plates) were preincubated at 37°C for 2 h without or with Tpl2 inhibitor (3 µM) and then incubated for the indicated times without or with Tpl2-inhibitor (3 µM), and without (basal) or with glucose (10 mmol/L), IL-1β alone (10000 U/ml, 20 ng/ml), or a cytokine mix (100 U/ml IL-1β (0. 2ng/ml), 500 U/ml TNFα (50 ng/ml), and 100 U/ml IFNγ (30 ng/ml)), as indicated in the figure legend. For human islets, the cytokine mix was 1000 U/ml IL-1β (2 ng/ml), 1000 U/ml TNFα (28ng/ml) and 1000U/ml IFNγ (833ng/ml).

To evaluate the role of Tpl2 following a prolonged exposure to cytokines, long term experiments (24-72 h) were performed in RPMI 1640 medium containing 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, glucose (11.1 mmol/L for INS-1E cells and mouse islets, and 5.6 mmol/L for human islets). The medium was supplemented with FBS (7.5% for INS-1E cells and 10% for mouse islets) or albumin (0.5% of BSA for IL-1 β alone on INS-1E cells, and 1% of human albumin for human islets). INS-1E cells (~70% confluence in 6-well plates), mouse (5-10 islets per condition in 24-well plates) or human islets (500-2000 IEQ per condition in 60 mm Petri dishes) were preincubated at 37°C for 2 h without or with Tpl2 inhibitor (3 µM), and then incubated for the indicated times, without or with Tpl2-inhibitor (3 µM), and without (control) or with IL-1 β alone, and/or a cytokine mix (same concentrations as for short term experiments), as indicated in the figure legend. All experiments on human islets were performed at the Diabetes Cellular Therapy Laboratory of Montpellier.

To evaluate the role of Tpl2 in the presence of cytokines and chemokines secreted by activated macrophages, RAW macrophages (5×10^6 cells / 100 mm) were incubated for 24 h in 6 ml of culture medium containing LPS (0.5 ng/ml). After 24 h, the conditioned medium (CM) was collected and transferred onto INS-1E cells (0.7 ml of CM/well of a 12 well plate) treated without or with the Tpl2 inhibitor (5 µM) for 1 h. For control conditions, cultured medium (Control medium) containing the same concentration of LPS and Tpl2 inhibitor was added onto the INS-1E cells. After 24 h, cells were lysed for cleaved caspase 3 analysis by western blot.

Western blotting. INS-1E cells, mouse (200-300 islets per condition), rat (300-500 islets per condition) and human islets (~500 IEQ per condition) were washed once with cold PBS, frozen in liquid azote, and lysed in a cold lysis buffer (see compositions in (53, 54)) by sonication. Cell or islet lysates were then clarified by centrifugation (13,000 rpm for 30 min at 4°C), and protein concentration was determined using the BCA method. Proteins were denatured by boiling for 5 min in Laemmli sample buffer, and equal amounts of proteins (15-30 µg of protein/lane) were

separated through a 10 or 12.5% SDS-PAGE gel and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking 1 h at room temperature, membranes were incubated overnight at 4° C with specific primary antibodies (1:250 to 1:4000 dilutions), and then incubated 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-linked secondary antibody (1:2000). Proteins were visualized by enhanced chemiluminescence detection. Autoradiographs were digitized, and the band density was analyzed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Insulin secretion and $[Ca^{2+}]_c$ measurements. After a 24 or 72 h incubation period (mouse or human islets, respectively) in RPMI with or without Tpl2 inhibitor and cytokines, isolated islets (5 mouse islets or 3 x 50 human IEQ per condition) were pre-incubated for 1 h for stabilization in KRB buffer (53, 54) containing glucose 2.8-3 mmol/L, followed by a 1 h incubation at 2.8-3 mmol/L and an additional 1 h at glucose 20 mmol/L (human) or 15 mmol/L (mouse). Aliquots from the incubation buffers were collected, cleared by centrifugation, and frozen. Extraction of total islet insulin content was performed by ethanol acid followed by sonication. Insulin release and content were measured by radioimmunoassay (RIA) (Milipore, SAS FRANCE) following the manufacturer's instructions, and normalized to insulin content (expressed as ng/ml/islet). For $[Ca^{2+}]_c$ measurements, cultured islets were loaded with 2 μ mol/l Fura2-Leak-Resistant-AM (Tef Labs, Austin, TX, USA) for 2 h, before being imaged as described (60).

Cell and islet apoptosis. The presence of apoptotic INS-1E cells was investigated by Western blot analysis and indicated by the presence of the 17 kDa cleaved form of caspase-3, which corresponds to the active pro-apoptotic form of caspase-3, and the 89 kDa cleaved form of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) involved in DNA repair and cell survival. Mouse islets apoptosis was assessed by measurement of caspase-3/7 activity using the "Caspase-Glo® 3/7 Assay" (Promega Corp. Madison, Wisc., USA) according to the manufacturer's instructions. This kit is based on the cleavage of the DEVD sequence of a luminogenic substrate

by the caspases 3 and 7, resulting in a luminescent signal. Briefly, caspase-3/7-Glo reagent was added after the 24 h incubation of islets in 96-well plates (10 islets of approximately equivalent size per well), and the samples were incubated at 37 ° C for 2 h. Luminescence was measured using a TECAN infinite 200 plate reader. Total cell death in mouse and human islets was evaluated using the Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit (Roche), as per the manufacturer's instructions, using 20 µl of culture supernatant. As a consequence of our prolonged treatments, DNA fragments were present in the supernatant of cultured cells as the result of the lysis of late apoptotic cells as well as necrotic cells. Absorbance was measured at 405 nm using a Mithras® LB940 Reader (Berthold, Thoiry, France) and the results expressed in arbitrary units of oligonucleosome-associated histone (DNA fragmentation).

Statistical analysis. All experiments were independently repeated at least three times. Results are expressed as means ± SEM for n independent experiments. The statistical significance between means was assessed by unpaired Student t-test, or by ANOVA followed by Newman-Keuls or Bonferroni post-hoc analyses. Analyses were performed with GraphPad Prism 5 software. A *P* value <0.05 was considered significant.

Study approval. All animal studies have been approved by the Ministry of Agriculture, France (D34-172-13). Human pancreases from five brain-dead donors were harvested in accordance with the French Agence de la biomédecine and the coordination center for organs and tissues transplantation of Montpellier Hospital (Gui de Chauliac Hospital). Isolated human pancreatic islet samples were collected and handled in accordance with the center for biological sample collections of Montpellier hospital (CCBMH), and the diabetes cellular therapy laboratory (Institute of Research in Biotherapy, Montpellier). Written informed consent was received from family of human donors prior to performing islet isolation and inclusion in the study.

Acknowledgments

The authors thank M. Roussel for help with INS-1E experiments, Dr C. Tourrel-Cuzin for providing islets from GK and Wistar rats, Dr Vachieri-Lahaye and the Coordination des greffes of Montpellier CHU for providing human pancreas, and the laboratory of Pr. D. Bosco and Pr T. Berney and for providing human islets from Geneva University Laboratory, through the JDRF award 31-2008-413 (ECIT Islet for Basic Research program).

This work was supported by grants obtained from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, Paris, France), from the Région Languedoc-Roussillon (France) (to S.D.), from the Société d'Accélération du Transfert de Technologies Languedoc Roussillon (SATT, AxLR) (to S.D.), and by the grant TPLIRBCCELL (ANR-2010-BLANC-1117-01) from the Agence Nationale de la Recherche (ANR, Paris, France) (to J-F.T. and S.D.). E.V. is the recipient of the CIFRE N°2009/1131 doctoral fellowship from the Association Nationale de la Recherche et de la technologie (ANRT, Paris, France), INSERM and the SARL Médecine-Biologie-Méditerranée (Montpellier, France). F.C. is the recipient of a doctoral fellowship from INSERM / Région PROVENCE-ALPES-CÔTE D'AZUR and of a grant from the "Société Francophone du Diabète" (SFD).

References

1. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1802–1812.
2. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):98–107.
3. Mäkinen S, Skrobuk P, Nguyen YH, Koistinen H. [Mechanisms of insulin resistance]. *Duodecim Lääketieteellinen Aikakauskirja*. 2013;129(20):2115–2122.
4. Ramadan JW, Steiner SR, O'Neill CM, Nunemaker CS. The central role of calcium in the effects of cytokines on beta-cell function: implications for type 1 and type 2 diabetes. *Cell Calcium*. 2011;50(6):481–490.
5. Donath MY, Böni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, Ehses JA. Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell in type 2 diabetes. *Physiol Bethesda Md*. 2009;24:325–331.
6. Maedler K et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest*. 2002;110(6):851–860.
7. Ehses JA et al. IL-1 antagonism reduces hyperglycemia and tissue inflammation in the type 2 diabetic GK rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):13998–14003.
8. Homo-Delarche F et al. Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat. *Diabetes*. 2006;55(6):1625–1633.
9. Ehses JA et al. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2007;56(9):2356–2370.
10. Böni-Schnetzler M et al. Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology*. 2009;150(12):5218–5229.
11. Donath MY, Böni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, Halban PA, Ehses JA. Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function. *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2010;21(5):261–267.

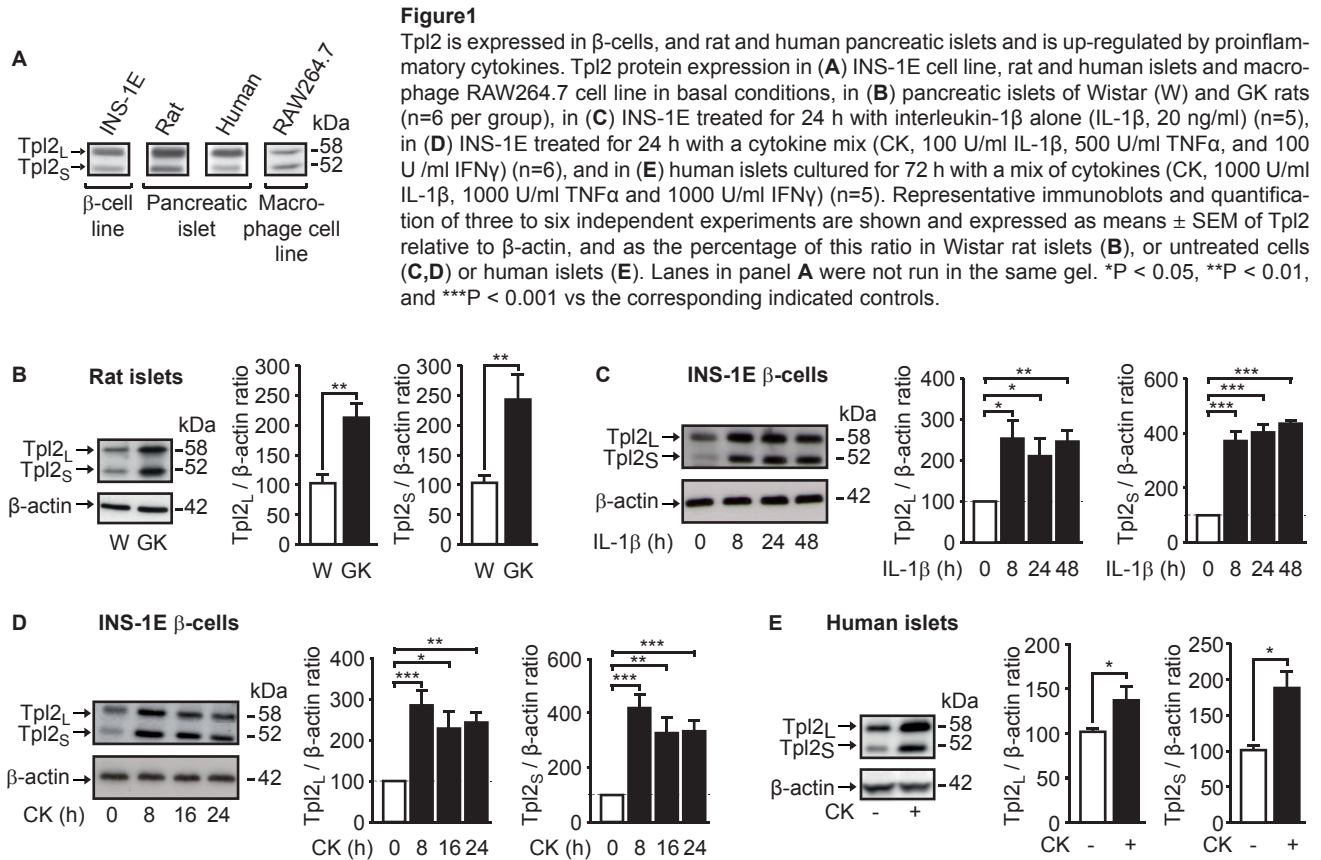
12. Cardozo AK, Kruhøffer M, Leeman R, Orntoft T, Eizirik DL. Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic beta-cells by high-density oligonucleotide arrays. *Diabetes*. 2001;50(5):909–920.
13. Böni-Schnetzler M, Donath MY. How biologics targeting the IL-1 system are being considered for the treatment of type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;76(2):263–268.
14. Larsen CM et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2007;356(15):1517–1526.
15. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death—the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*. 2001;44(12):2115–2133.
16. Maedler K et al. Glucose- and interleukin-1beta-induced beta-cell apoptosis requires Ca²⁺ influx and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 activation and is prevented by a sulfonylurea receptor 1/inwardly rectifying K⁺ channel 6.2 (SUR/Kir6.2) selective potassium channel opener in human islets. *Diabetes*. 2004;53(7):1706–1713.
17. Larsen CM et al. Interleukin-1beta-induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*. 1998;273(24):15294–15300.
18. Pavlovic D, Andersen NA, Mandrup-Poulsen T, Eizirik DL. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 contributes to cytokine-induced apoptosis in purified rat pancreatic beta-cells. *Eur Cytokine Netw*. 2000;11(2):267–274.
19. Das S et al. Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF-kappaB in a cell-type and stimulus-specific manner. *J Biol Chem*. 2005;280(25):23748–23757.
20. Vougioukalaki M, Kanellis DC, Gkouskou K, Eliopoulos AG. Tpl2 kinase signal transduction in inflammation and cancer. *Cancer Lett*. 2011;304(2):80–89.
21. Ceppo F et al. Implication of the tpl2 kinase in inflammatory changes and insulin resistance induced by the interaction between adipocytes and macrophages. *Endocrinology*. 2014;155(3):951–964.

22. Jager J et al. Tpl2 Kinase is upregulated in adipose tissue in obesity and may mediate interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α effects on extracellular signal-regulated kinase activation and lipolysis. *Diabetes*. 2010;59(1):61–70.
23. Dumitru CD et al. TNF- α induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell*. 2000;103(7):1071–1083.
24. Perfield JW 2nd et al. Tumor progression locus 2 (TPL2) regulates obesity-associated inflammation and insulin resistance. *Diabetes*. 2011;60(4):1168–1176.
25. Aoki M et al. The human cot proto-oncogene encodes two protein serine/threonine kinases with different transforming activities by alternative initiation of translation. *J Biol Chem*. 1993;268(30):22723–22732.
26. Portha B et al. The GK rat beta-cell: a prototype for the diseased human beta-cell in type 2 diabetes? *Mol Cell Endocrinol*. 2009;297(1-2):73–85.
27. Cho J, Melnick M, Solidakis GP, Tschlis PN. Tpl2 (tumor progression locus 2) phosphorylation at Thr290 is induced by lipopolysaccharide via an Ikappa-B Kinase-beta-dependent pathway and is required for Tpl2 activation by external signals. *J Biol Chem*. 2005;280(21):20442–20448.
28. Kane LP, Mollenauer MN, Xu Z, Turck CW, Weiss A. Akt-dependent phosphorylation specifically regulates Cot induction of NF-kappa B-dependent transcription. *Mol Cell Biol*. 2002;22(16):5962–5974.
29. Gantke T, Sriskantharajah S, Ley SC. Regulation and function of TPL-2, an IkB kinase-regulated MAP kinase kinase kinase. *Cell Res*. 2011;21(1):131–145.
30. Beinke S, Robinson MJ, Hugunin M, Ley SC. Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade is regulated by IkappaB kinase-induced proteolysis of NF-kappaB1 p105. *Mol Cell Biol*. 2004;24(21):9658–9667.

31. Lawrenz M et al. Genetic and pharmacological targeting of TPL-2 kinase ameliorates experimental colitis: a potential target for the treatment of Crohn's disease? *Mucosal Immunol.* 2012;5(2):129–139.
32. Costes S et al. ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival. *Diabetes.* 2006;55(8):2220–2230.
33. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem.* 1994;269(49):30761–30764.
34. Rabinovitch A, Sumoski W, Rajotte RV, Warnock GL. Cytotoxic Effects of Cytokines on Human Pancreatic Islet Cells in Monolayer Culture. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71(1):152–156.
35. Cetkovic-Cvrlje M, Eizirik DL. TNF-alpha and IFN-gamma potentiate the deleterious effects of IL-1 beta on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine.* 1994;6(4):399–406.
36. Cavaillon JM. Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother Bioméd Pharmacothérapie.* 1994;48(10):445–453.
37. Eizirik DL. Interleukin-1 induced impairment in pancreatic islet oxidative metabolism of glucose is potentiated by tumor necrosis factor. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1988;119(3):321–325.
38. Dunger A et al. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma inhibit insulin secretion and cause DNA damage in unweaned-rat islets. Extent of nitric oxide involvement. *Diabetes.* 1996;45(2):183–189.
39. Eliopoulos AG, Das S, Tschlis PN. The Tyrosine Kinase Syk Regulates TPL2 Activation Signals. *J Biol Chem.* 2006;281(3):1371–1380.

40. Hostens K et al. Exposure of human islets to cytokines can result in disproportionately elevated proinsulin release. *J Clin Invest.* 1999;104(1):67–72.
41. Eizirik DL et al. Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation. *J Clin Invest.* 1994;93(5):1968.
42. Welsh N, Eizirik DL, Bendtzen K, Sandler S. Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production in isolated rat pancreatic islets requires gene transcription and may lead to inhibition of the Krebs cycle enzyme aconitase. *Endocrinology.* 1991;129(6):3167–3173.
43. Eizirik DL, Cagliero E, Björklund A, Welsh N. Interleukin-1 beta induces the expression of an isoform of nitric oxide synthase in insulin-producing cells, which is similar to that observed in activated macrophages. *FEBS Lett.* 1992;308(3):249–252.
44. Patriotis C et al. Tpl-2 induces apoptosis by promoting the assembly of protein complexes that contain caspase-9, the adapter protein Tvl-1, and procaspase-3. *J Cell Physiol.* 2001;187(2):176–187.
45. Yaomura T et al. Serine/threonine kinase, Cot/Tpl2, regulates renal cell apoptosis in ischaemia/reperfusion injury. *Nephrol Carlton Vic.* 2008;13(5):397–404.
46. Lancaster GI et al. Tumor progression locus 2 (Tpl2) deficiency does not protect against obesity-induced metabolic disease. *PLoS One.* 2012;7(6):e39100.
47. Ballak DB et al. MAP3K8 (TPL2/COT) Affects Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation without Systemic Effects in Humans and in Mice. *PLoS One.* 2014;9(2):e89615.
48. Ma BW et al. Routine habitat change: a source of unrecognized transient alteration of intestinal microbiota in laboratory mice. *PLoS One.* 2012;7(10):e47416.
49. Shapiro AM et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000;343(4):230–238.
50. Barton FB et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes Care.* 2012;35(7):1436–1445.

51. Hu Y et al. Inhibition of Tpl2 kinase and TNF α production with quinoline-3-carbonitriles for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16(23):6067–6072.
52. George D et al. Discovery of thieno[2,3-c]pyridines as potent COT inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;18(18):4952–4955.
53. Merglen A et al. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology*. 2004;145(2):667–678.
54. Broca C et al. β -Arrestin 1 is required for PAC1 receptor-mediated potentiation of long-lasting ERK1/2 activation by glucose in pancreatic β -cells. *J Biol Chem*. 2009;284(7):4332–4342.
55. Goto Y, Suzuki K, Ono T, Sasaki M, Toyota T. Development of diabetes in the non-obese NIDDM rat (GK rat). *Adv Exp Med Biol*. 1988;246:29–31.
56. Perepechaeva M, Kolosova N, Grishanova A. Molecular mechanisms of cold-induced CYP1A activation in rat liver microsomes. *J Physiol Biochem*. 2011;67(4):499–510.
57. Turrel C et al. Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the β -cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes*. 2002;51(5):1443–1452.
58. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes*. 1988;37(4):413–420.
59. Bucher P et al. Assessment of a novel two-component enzyme preparation for human islet isolation and transplantation. *Transplantation*. 2005;79(1):91–97.
60. Ravier MA et al. β -Arrestin2 plays a key role in the modulation of the pancreatic β cell mass in mice. *Diabetologia*. 2014;57(3):532–541.



INS-1E β -cell line

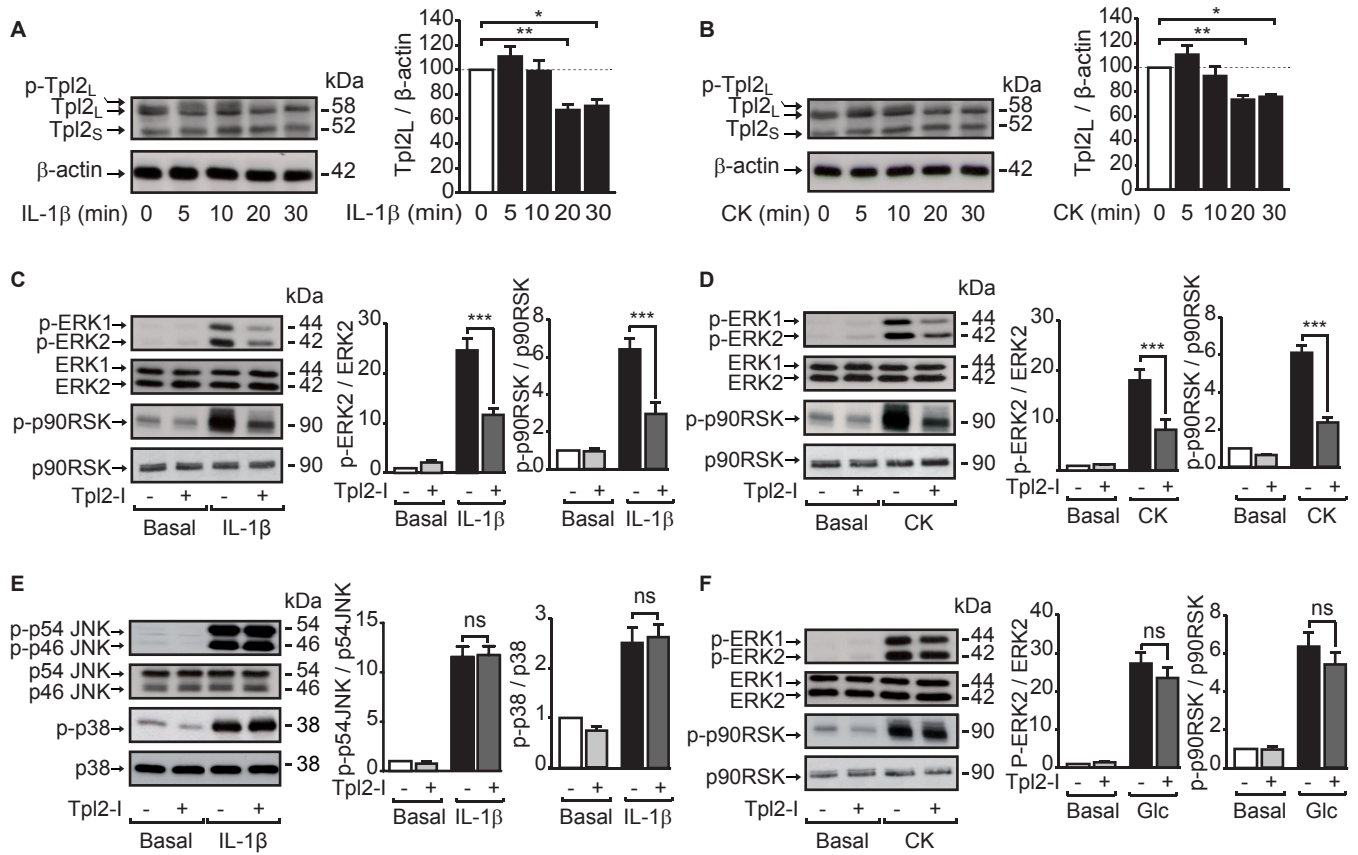


Figure 2

Tpl2 inhibitor is a specific blocker of cytokine-induced ERK1/2 and p90RSK activation in INS-1E β -cells. Total Tpl2L expression (phosphorylated and non-phosphorylated) with β -actin as loading control in INS-1E cells unstimulated (B, Basal) or stimulated with (A) IL-1 β (20 ng/ml, n=4), or (B) a cytokine mix (CK, 100 U/ml IL-1 β , 500 U/ml TNF α , and 100 U/ml IFN γ , n=4). (C,D,F) Levels of phosphorylated and total proteins for ERK1/2, and p90RSK in INS-E cells treated without or with a Tpl2 inhibitor (Tpl2-I, 3 μ M) and unstimulated (B, Basal) or stimulated with (C) IL-1 β (20 ng/ml, 20 min, n=5), (D) a cytokine mix (CK, 100 U/ml IL-1 β , 500 U/ml TNF α , and 100 U/ml IFN γ , n=5), or (F) 10 mM glucose (Glc) (n=5). (E) Levels of phosphorylated and total proteins for p38MAPK and p54/p46 JNK in INS-1E cells treated without or with a Tpl2-I (3 μ M), and unstimulated (B, Basal) or stimulated with IL-1 β (20 ng/ml, 20 min, n=5). Representative immunoblots and quantification of four to five independent experiments are shown and expressed as a percentage of the ratio of Tpl2 to β -actin protein amount in untreated cells (A,B), or as ratio of phosphorylated to total protein amount and fold of phosphorylation over basal in cells without treatment (C-F). Data are presented as the means \pm SEM. * P<0.05, ** P<0.01, and *** P<0.001 vs corresponded indicated controls.

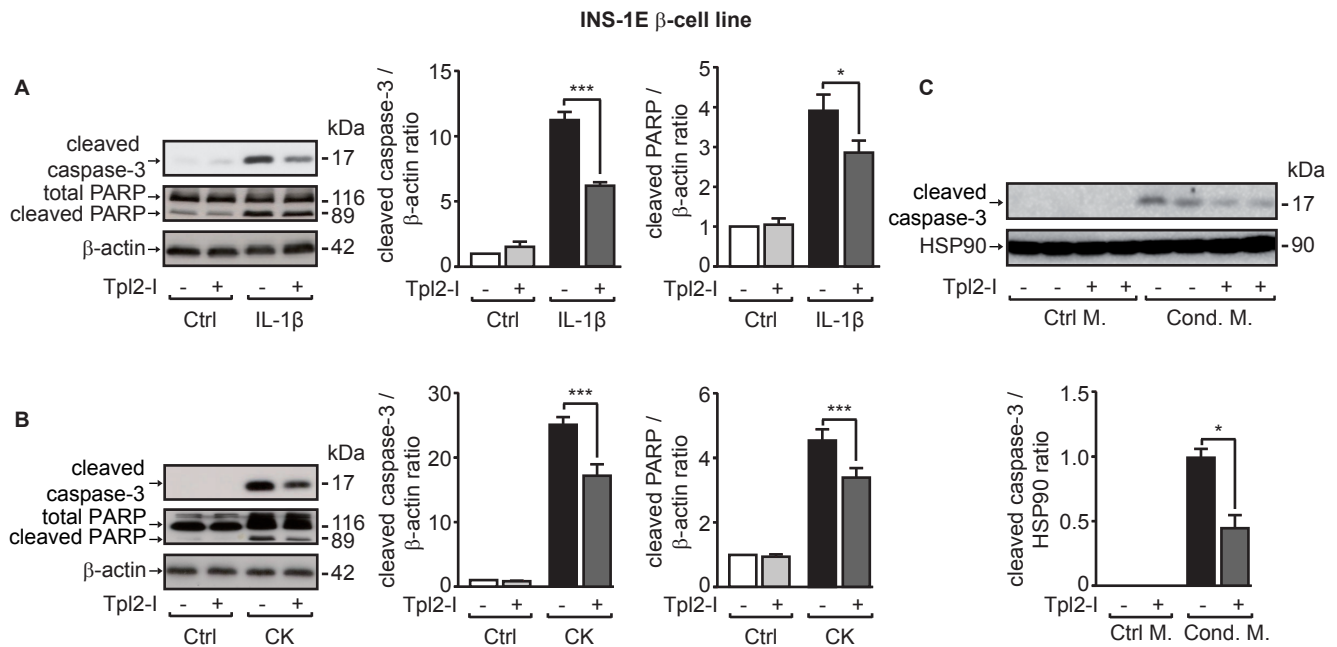


Figure 3

Tpl2 inhibition reduces apoptotic effects of inflammatory cytokines in INS-1E cells. Level of expression of the cleaved and total forms of caspase-3 and PARP in INS-1E cells treated without or with Tpl2 inhibitor (Tpl2-I, 3-5 μ M) and in the absence (Control, Ctrl) or in the presence of (A) IL-1 β (20 ng/ml, 48h, n=3), (B) a mix of cytokines (CK, 100 U/ml IL-1 β , 500 U/ml TNF α and 100 U/ml IFN γ , 24h, n=10), (C) a control medium (Ctrl M) or a conditioned medium (Cond. M) from RAW macrophages activated with LPS (0.5 ng/ml, 24 h, n=3). Representative immunoblots and means \pm SEM of three to ten independent experiments are shown. Data are expressed as ratio of cleaved caspase-3 or cleaved PARP to loading control (β -actin (A, B) or HSP90 (C)) and normalized to cells without treatment. *P < 0.05 and ***P<0.001 vs corresponded indicated controls.

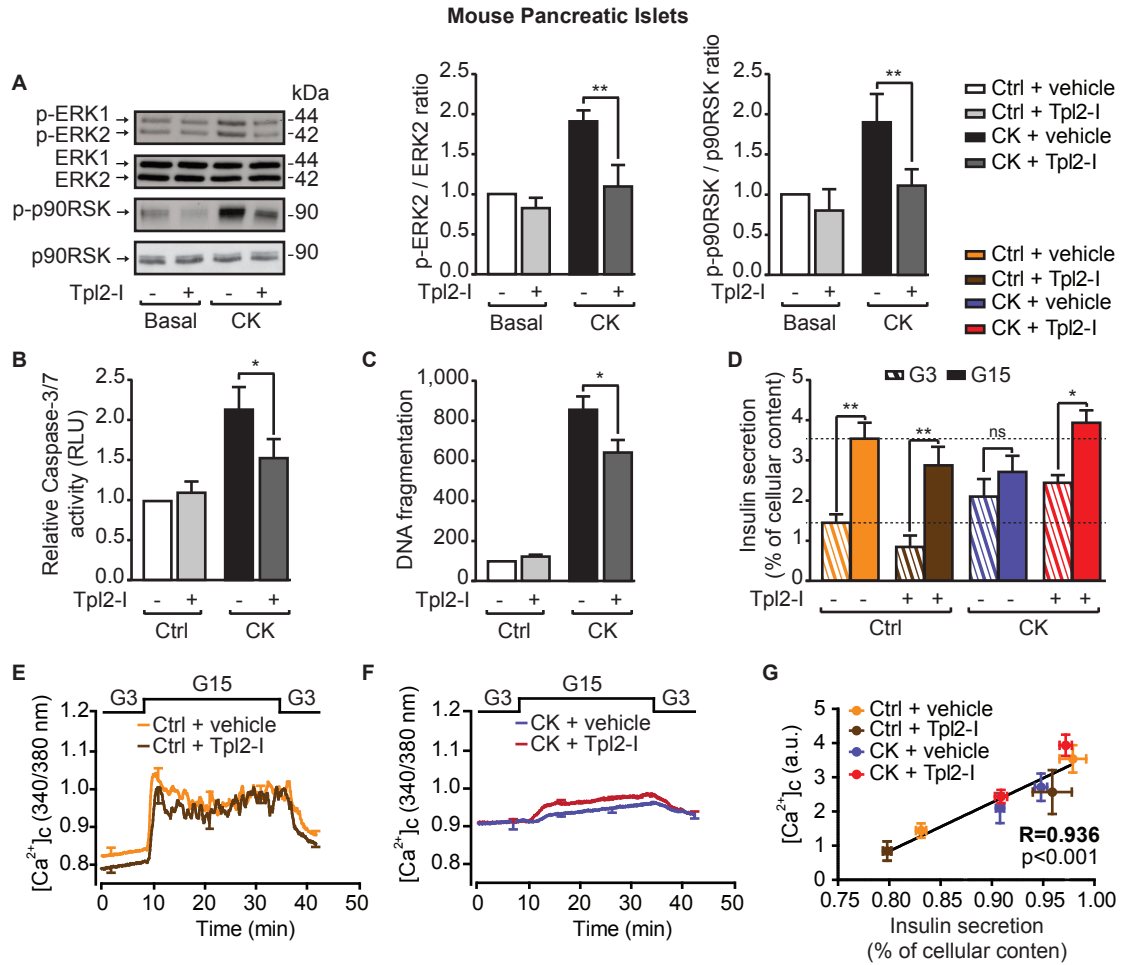


Figure 4

Tpl2 inhibition reduces ERK1/2 activation and deleterious effects of inflammatory cytokines in mouse pancreatic islets. **(A)** Level of phosphorylated and total protein amount of ERK1/2 and p90RSK in mouse pancreatic islets cultured in presence or absence of Tpl2 inhibitor (Tpl2-I, 3 μ M) for 2 h, and then non-stimulated (Basal) or stimulated with a cytokine mix (CK, 100 U/ml IL-1 β , 500 U/ml TNF α , and 100 U/ml IFN γ) for 20 min. Representative immunoblots and means \pm SEM of four independent experiments are shown. Data are expressed as ratio of phosphorylated to total protein amount and as fold of phosphorylation over basal in cells without treatment. **P < 0.01 vs stimulus effect in control cells. **(B-D)** Mouse islets were pre-treated for 2 h without or with Tpl2-I (3 μ M), and then untreated (Control, Ctrl) or treated for 24 h with a cytokine mix (as in **A**) in presence or absence of Tpl2-I (3 μ M) before **(B)** measurement of Caspase-3/7 activity, **(C)** measurement of DNA fragmentation, or **(D)** GSIS (hatched boxes: glucose 3 mM (G3), solid boxes: glucose 15 mM (G15)). Each column represents mean \pm SEM of 6 to 8 mice analyzed. *P<0.05, ** P<0.01, and ***P<0.001 vs relative indicated controls **(B-D)**. **(E, F)** Intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) changes monitored in perfused **(E)** control islets or **(F)** islets treated for 24 h with the cytokine mix, and incubated without or with Tpl2-I (3 μ M) during 2 h before and during the CK treatment. Data are mean \pm SEM of 3 experiments with each 3 mice per group. **(G)** Correlation between insulin secretion and $[Ca^{2+}]_i$.

Human Pancreatic Islets

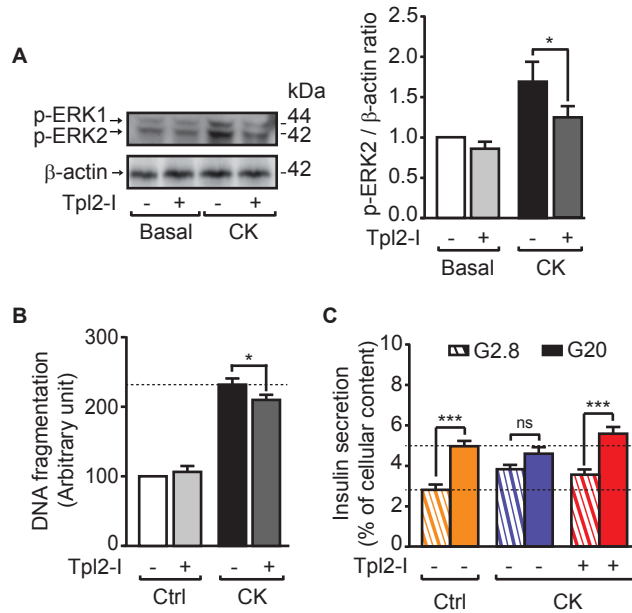


Figure 5

Tpl2 inhibition protects human pancreatic islets from cytokine-induced β -cell death and defects in insulin secretion. **(A)** Level of phosphorylated and total protein amount of ERK1/2 in human pancreatic islets cultured in the absence or presence of Tpl2 inhibitor (Tpl2-I, 3 μ M) for 2 h and then unstimulated (Basal) or stimulated with a cytokine mix (CK, 1000 U/ml IL-1 β , 1000 U/ml TNF α , and 1000 U/ml IFN γ) for 20 min, without or with Tpl2-I (3 μ M). Representative immunoblots and means \pm SEM of three independent experiments are shown. Data are expressed as ratio of phosphorylated ERK1/2 to β -actin and fold of phosphorylation over basal in islets without treatment. **(B)** Measurement of DNA fragmentation in supernatant of human islets treated without or with Tpl2-I (3 μ M) for 2 h and then cultured in absence (Control, Ctrl) or in presence of the cytokine mix (CK) for 72h and in the presence or absence of Tpl2-I (3 μ M). **(C)** GSIS in the human islets treated as in B. Hatched boxes represent glucose 2.8 mM (G2.8), solid boxes represent glucose 20 mM (G20). Each column represents the mean \pm SEM of 15 replicates (5 donors, each experiment in triplicate). * P < 0.05, and *** P < 0.001 between low and high glucose **(C)** or vs related indicated controls **(A,B)**.

in vivo Experiments in *db/+* and *db/db* Mice

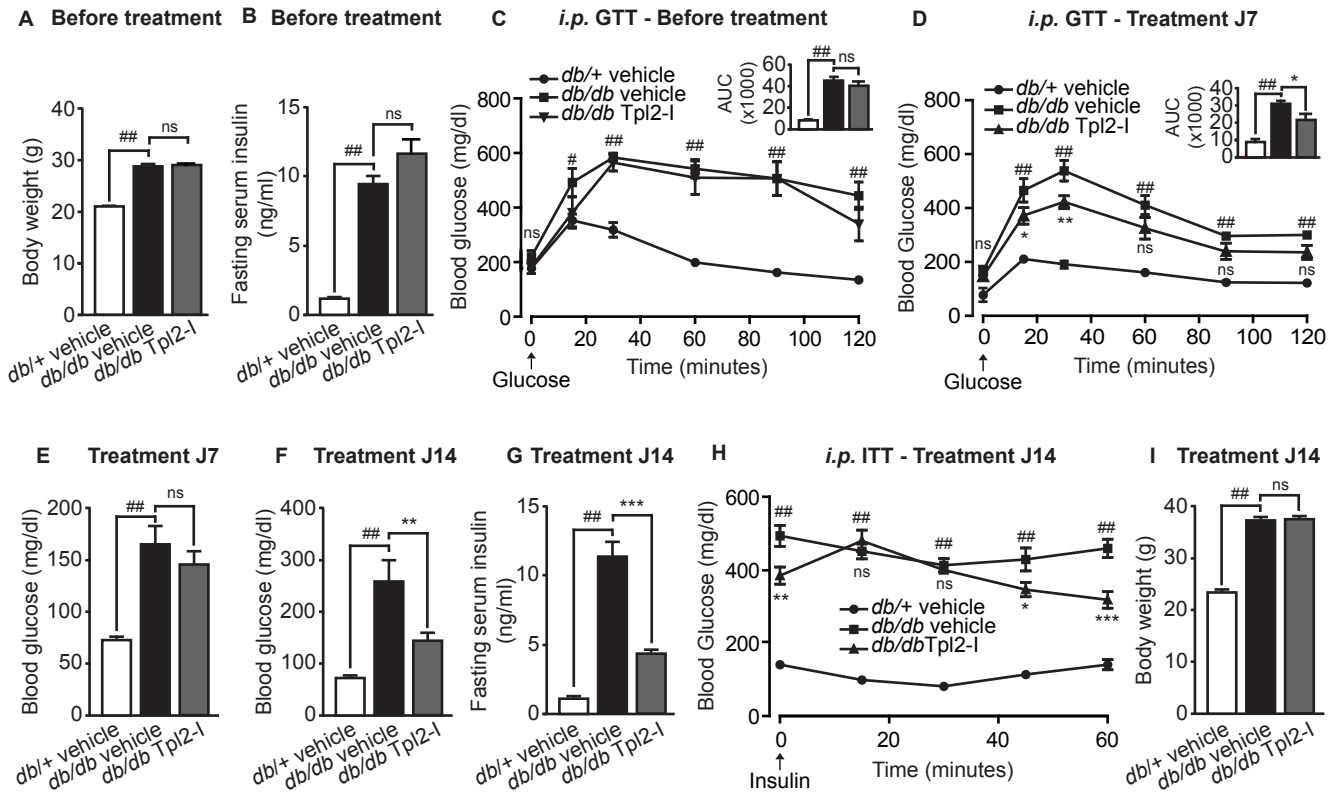


Figure 6

Tpl2 inhibition improves fasting hyperglycemia, glucose tolerance and insulin sensitivity in *db/db* mice. (A-I) 6 week-old *db/db* mice were randomized in two groups and treated for 14 days with daily *i.p.* injection of either Tpl2-inhibitor (2.5 mg/kg, *db/db* Tpl2-I) or vehicle (KRB/DMSO, *db/db* vehicle). As a control, *db/+* mice were treated with vehicle (*db/+* vehicle) for the same period of time. Metabolic parameters were measured in each group before the treatment (A-C) and after 7 (D,E) or 14 (F-I) days of treatment. (A) Body weight, (B) fasting serum insulin, and (C) glucose tolerance measured by *i.p.* glucose tolerance test (GTT) in each group prior to Tpl2-I treatment. Means \pm SEM for 5 mice in each group are presented. (D) Glucose tolerance measured by *i.p.* GTT after 7 days of treatment. (E-I) fasting glucose after 7 (E) and 14 (F) days of treatment, and (G) fasting serum insulin 14 days after the onset of treatment. (H) Insulin tolerance test (ITT) performed 14 days after treatment onset. (I) Body weight 14 days after treatment onset. Means \pm SEM for 5 mice in each group are shown. # $P < 0.05$, ## $P < 0.001$ *db/db* vehicle-treated mice vs *db/+* mice, and * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ *db/db* Tpl2-I-treated mice vs *db/db* vehicle-treated mice. ns: not significant.

Revues

Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance

Tanti JF., **Ceppo F.**, Jager J., Berthou F

Front Endocrinol, 2013, 8;3:181

Implication of MAP kinases in obesity-induced inflammation and insulin resistance

Ceppo F., Jager J., Berthou F., Giorgetti-Peraldi S., Cormont M., Bost F., Tanti JF

Biol Aujourd'hui, 2014, 208(2):97-107



Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance

Jean-François Tanti^{1,2*}, Franck Ceppo^{1,2}, Jennifer Jager^{1,2†} and Flavien Berthou^{1,2}

¹ INSERM U1065, Mediterranean Center of Molecular Medicine (C3M), Team “Molecular and Cellular Physiopathology of Obesity and Diabetes,” Nice, France

² Faculty of Medicine, University of Nice Sophia-Antipolis, Nice, France

Edited by:

Tsuguhito Ota, Kanazawa University, Japan

Reviewed by:

Undurti N. Das, UND Life Sciences, USA

Marek Bolanowski, Wrocław Medical University, Poland

*Correspondence:

Jean-François Tanti, INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Bâtiment Archimède, 151, route de St. Antoine de Ginestière, BP 2 3194, 06204, Nice Cedex 3, France.
e-mail: tanti@unice.fr

† Present address:

Jennifer Jager, Division of Endocrinology, Diabetes, and Metabolism, Department of Medicine, Department of Genetics, and The Institute for Diabetes, Obesity, and Metabolism, Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA.

Obesity is characterized by the development of a low-grade chronic inflammatory state in different metabolic tissues including adipose tissue and liver. This inflammation develops in response to an excess of nutrient flux and is now recognized as an important link between obesity and insulin resistance. Several dietary factors like saturated fatty acids and glucose as well as changes in gut microbiota have been proposed as triggers of this metabolic inflammation through the activation of pattern-recognition receptors (PRRs), including Toll-like receptors (TLR), inflammasome, and nucleotide oligomerization domain (NOD). The consequences are the production of pro-inflammatory cytokines and the recruitment of immune cells such as macrophages and T lymphocytes in metabolic tissues. Inflammatory cytokines activate several kinases like IKK β , mTOR/S6 kinase, and MAP kinases as well as SOCS proteins that interfere with insulin signaling and action in adipocytes and hepatocytes. In this review, we summarize recent studies demonstrating that PRRs and stress kinases are important integrators of metabolic and inflammatory stress signals in metabolic tissues leading to peripheral and central insulin resistance and metabolic dysfunction. We discuss recent data obtained with genetically modified mice and pharmacological approaches suggesting that these inflammatory pathways are potential novel pharmacological targets for the management of obesity-associated insulin resistance.

Keywords: obesity, insulin resistance, inflammation, adipose tissue, pattern-recognition receptors, stress kinases, macrophages

INTRODUCTION

Obesity is characterized by an excessive adipose tissue expansion due to an increase in nutrients intake and insufficient energetic expenditure. Obesity has dramatically increased worldwide and leads to numerous adverse metabolic disorders including cardiovascular diseases, type 2 diabetes, and some forms of cancer. Insulin resistance is associated with obesity and is a central component of type 2 diabetes, leading to altered glucose and lipid metabolism in adipose tissue, liver, and skeletal muscles. Insulin resistance is characterized by a decrease in insulin signaling mainly in the Insulin Receptor Substrate (IRS)/PI-3-kinase/PKB axis that is responsible for most of the metabolic actions of the hormone (Taniguchi et al., 2006). It is now recognized that a chronic low-grade systemic and local inflammation that develops during obesity could connect obesity to the development of insulin resistance (Gregor and Hotamisligil, 2011). This inflammatory state has been reported in different organs involved in the control of metabolic homeostasis including adipose tissue, liver, endocrine pancreas, hypothalamus, and possibly skeletal muscles. The chronic inflammation is caused by an excess of nutrient intake and has been named metabolic inflammation or meta-inflammation (Gregor and Hotamisligil, 2011). Several dietary factors including saturated fatty acids and glucose as well

as a change in gut microbiota have been proposed as triggers of this metabolic inflammation that involves both metabolic cells, such as adipocytes, and a change in the population of immune cells in metabolic tissues (Lolmede et al., 2011; Bertola et al., 2012; Sun et al., 2012). Hypoxia that develops in adipose tissue could also participate in its inflammation and has been recently involved in insulin resistance of adipocytes (Regazzetti et al., 2009; Wood et al., 2009).

In this review, we will first describe the major mediators that link the excess of nutrients to the production of inflammatory cytokines, focusing on pattern-recognition receptors (PRRs). We will then discuss the intracellular signaling pathways activated by inflammatory mediators and involved in the desensitization of insulin signaling. We will also discuss whether and how the blockade of these mechanisms could improve insulin sensitivity.

IMMUNE SENSORS LINKING NUTRITIONAL STRESS TO OBESITY-INDUCED INFLAMMATION AND INSULIN RESISTANCE

TOLL-LIKE RECEPTORS

Toll-like receptors (TLR) belong to the family of PRRs and play a crucial role in innate immunity by their ability to sense pathogens through the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)

and to detect tissue injury through the danger-associated molecular patterns (DAMPs) (Mogensen, 2009). TLRs 1/2/4/5/6/11 are plasma membrane proteins whereas TLRs 3/7/8/9 are present in intracellular compartments. Microbial components induce the activation of the TLR signaling through a MyD88 (myeloid differentiation factor)-dependent pathway, except for TLR3, leading to the activation of the transcription factors NF- κ B and AP-1 and the production of inflammatory cytokines. Mitogen-activated protein kinases including extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), JNK, and p38 are also activated by TLRs engagement. TLR3 and TLR4 activation also induces an IFN- β response through a MyD88-independent but TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing interferon)-dependent pathway (Mogensen, 2009).

Among the different members of the TLR family, several groups have reported a role for TLR2, TLR4 in inflammation and

insulin resistance during obesity (Fresno et al., 2011; Könner and Brüning, 2011). Most of the studies focused on TLR4 which is expressed in macrophages, dendritic cells but also in adipocytes, hepatocytes, muscles, and in the hypothalamus. TLR4 expression is increased in obese mice and obese and diabetic patients and negatively correlates with insulin sensitivity (Könner and Brüning, 2011). Recently it has been proposed that during obesity, metabolic endotoxemia contributes to the development of inflammation and metabolic disorders through the activation of TLR4 in metabolic tissues (**Figure 1**). Metabolic endotoxemia is defined as a moderate increase in circulating lipopolysaccharide (LPS) from Gram-negative bacteria and it develops owing to alterations in the composition of gut microbiota and to an increase in gut permeability (Cani and Delzenne, 2009; Burcelin et al., 2011). Further, high-fat diet could also enhance the translocation of live Gram-negative bacteria from the gut to the adipose

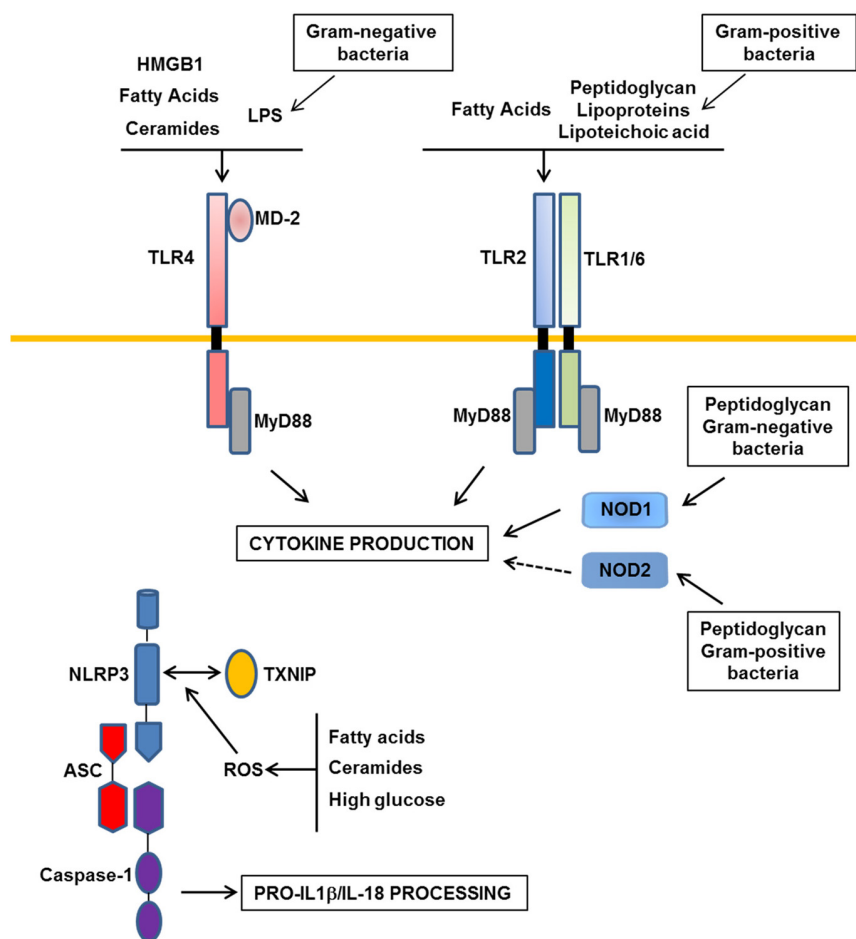


FIGURE 1 | Major Patterns-Recognition Receptors involved in obesity-induced inflammation. In obesity, the moderate increase in LPS derived from gram-negative commensal bacteria activates TLR4 (Toll-like receptors). TLR2 and NOD1/2 (Nucleotide Oligomerization Domain) could be activated by peptidoglycan, lipoproteins, and lipoteichoic acid from gram-negative or -positive commensal bacteria. In addition, nutrients such as saturated fatty acids and their metabolites ceramides could interact with TLR4 or could indirectly activate this receptor through the production

of DAMPs such as HMGB1. TLR2 could also be a receptor for saturated fatty acids. Following activation of these receptors, inflammatory cytokines are produced. Among them, IL-1 β and IL-18 should be processed in their mature forms by the NLRP3 inflammasome composed of NLRP3, ASC, and caspase-1. ROS production in response to a high level of fatty acids, ceramides, or glucose could trigger the association between TXNIP and NLRP3 leading to the activation of caspase-1 in the inflammasome complex.

tissue, a process that is dependent, at least partly, on CD14 that acts as a co-receptor with TLR4 to sense LPS (Amar et al., 2011).

Saturated fatty acids are other potential ligands of TLR4 both in adipocytes and macrophages leading to the production of inflammatory cytokines and also ceramides (Shi et al., 2006b; Radin et al., 2008; Fresno et al., 2011; Könnner and Brüning, 2011) (**Figure 1**). TLR4 also mediates the cross-talk between adipocytes and macrophages induced by fatty acids (Suganami et al., 2007b). However, a direct binding of saturated fatty acids to TLR4 has been recently challenged due to LPS contamination (Erridge and Samani, 2009). It is thus possible that saturated fatty acids indirectly interact with TLR4 through fetuin A (Pal et al., 2012). Alternatively, fatty acids might activate TLR4 signaling through the production of endogenous DAMPs such as HMGB1 (High-Mobility Group Box1) and/or through ceramides production (Fischer et al., 2007; Li et al., 2011) (**Figure 1**).

The *in vivo* pathophysiological importance of TLR4 in obesity-induced inflammation and insulin resistance was investigated by using mice deficient in TLR4 signaling owing to invalidation of TLR4 (TLR4^{-/-} mice) or to a loss-of-function mutation in the *Tlr4* gene (C3H/HeJ and C57BL/10ScN) (**Table 1**). The different studies have reported a mild reduction in inflammation in adipose tissue and liver or in the vasculature (Shi et al.,

2006b; Kim et al., 2007; Poggi et al., 2007; Suganami et al., 2007a; Tsukumo et al., 2007; Li et al., 2011; Orr et al., 2012; Ye et al., 2012). The lower inflammation in adipose tissue was linked to a decrease in macrophage infiltration or to a change in macrophage polarization toward a M2 anti-inflammatory phenotype (Shi et al., 2006b; Tsukumo et al., 2007; Davis et al., 2008; Orr et al., 2012). Reduction in inflammation in liver Kupffer cells and in liver parenchymal cells (Li et al., 2011; Ye et al., 2012) was associated with a decrease in hepatic steatosis or with a reduction in the progression from steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (Poggi et al., 2007; Tsukumo et al., 2007; Radin et al., 2008; Li et al., 2011; Orr et al., 2012; Ye et al., 2012). In contrast, contradictory results have been obtained concerning the development of obesity. Some studies have reported that C3H/HeJ, 10ScN, or male TLR4^{-/-} mice gained less weight on a high-fat diet than their respective controls (Tsukumo et al., 2007; Davis et al., 2008; Radin et al., 2008; Saberi et al., 2009; Orr et al., 2012). This phenotype could be related to a protection against diet-induced leptin or insulin resistance in the hypothalamus in the absence of a functional TLR4 signaling (Kleinridders et al., 2009; Milanski et al., 2009; Könnner and Brüning, 2011). However, other studies have described a higher feeding efficiency of the C3H/HeJ mice with increased adipose tissue mass and adipocyte hypertrophy (Poggi et al., 2007), an increase in body weight gain and

Table 1 | Phenotype of the different TLR4-deficient mice fed with a high-fat diet.

	Genotype	% Fat in diet	Body Weight gain	Whole-Body IS	Food Intake	Adipose Tissue inflammation	ATM	Adipose Tissue IS	Steatosis
Tsukumo et al.	C3H/HeJ	55	↓	↑	=	↓	↓	↑	↓
Poggi et al.	C3H/HeJ	45	=	=	↓	↓	=	↑	↓
Suganami et al.	C3H/HeJ	60	=	↑	ND	↓	=	ND	ND
Davis et al.	10 ScN	60	↓	↑	ND	↓ ±	↓	ND	ND
Radin et al.	10 ScN	45	↓	=	↓	ND	ND	ND	↓
Li et al.	10 ScN	60	↓		=	ND	ND	ND	↓
Shi et al.	TLR4 ^{-/-} F	60	↑	↑	↑	↓	↓	ND	ND
Shi et al.	TLR4 ^{-/-} M	60	=	=	=	↓	ND	ND	ND
Orr et al.	TLR4 ^{-/-}	45	↓	=	↓	↓ ±	↑ M2	ND	↓
Saberi et al.	TLR4 ^{-/-}	No data	↓	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ding et al.	TLR4 ^{-/-} LDLR ^{-/-}	35.5	=	=	=	=	=	ND	ND
Kim et al.	TLR4 ^{-/-}	60	=	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Saberi et al.	BMT-10ScN	No data	=	↑	=	↓	↓	↑	↓
Orr et al.	BMT-TLR4 ^{-/-}	45	=	=	ND	↓	↑ M2	ND	=
Coenen et al.	BMT-TLR4 ^{-/-}	41	=	=	ND	=	=	ND	ND

C3H/HeJ: Mice harboring a spontaneous missense mutation in the third exon in the *Tlr4* gene leading to a loss-of-function of TLR4.

10ScN: Mice that display a spontaneous mutation resulting in 7 kb deletion in the *Tlr4* gene that results in absence of both mRNA and protein expression.

TLR4^{-/-}: Mice with a knockout of the *Tlr4* gene. F female. M male.

BMT-10ScN: Transplantation of bone marrow from 10ScN mice into C57BL/6 mice.

BMT-TLR4^{-/-}: Transplantation of bone marrow from TLR4^{-/-} mice into C57BL/6 mice (Orr et al.) or into agouty (*A^y/a*)/LDL-receptor deficient mice (*A^y/a*; *Ldlr*^{-/-}) (Coenen et al.).

IS: Insulin Sensitivity.

ATM: Adipose tissue macrophages.

M2: macrophages with a M2 anti-inflammatory polarization.

ND: not determined in the study.

adipose tissue mass in female TLR4^{-/-} mice (Shi et al., 2006b) or no protection against obesity in male TLR4^{-/-} mice (Shi et al., 2006b; Kim et al., 2007). The majority of the studies have reported a reduction in the insulin resistance, at least in adipose tissue and liver (Shi et al., 2006b; Suganami et al., 2007a; Tsukumo et al., 2007; Poggi et al., 2007; Davis et al., 2008). However, some of them, mainly concerning male TLR4^{-/-}, did not show any improvement in whole-body insulin sensitivity (Shi et al., 2006b; Radin et al., 2008; Ding et al., 2012; Orr et al., 2012).

Different studies have investigated the consequences of TLR4 invalidation specifically in immune cells by transplantation of bone marrow from TLR4-deficient mice into wild-type recipients. In one study, mice developed obesity but with less inflammation and insulin resistance in adipose tissue and liver and no change in muscles (Saber et al., 2009). In contrast, two other studies using the same experimental strategy but in different genetic backgrounds, failed to observe any improvement in insulin resistance despite a reduction in adipose tissue inflammation and/or a shift in adipose tissue macrophage polarization toward a M2 anti-inflammatory state (Coenen et al., 2009; Orr et al., 2012).

In summary, the consequences on weight gain and insulin resistance are different depending on the genetic background, the sex of the mice, the duration, and the lipid composition of the diet. In this regard, the percentage of saturated lipids in the diet could be important since the protection against insulin resistance seemed to occur selectively when the diet contained a high level of saturated lipids (Davis et al., 2008). It remains to be determined whether the activation of TLR4 signaling by a saturated fat diet is due to a direct action of fatty acids on TLR4 or to an indirect effect through the production of endogenous DAMPs or through the modification of the gut microbiota leading to an increase in circulating LPS. Further, clarification is needed for the respective contribution of TLR4 signaling in hematopoietic vs. non-hematopoietic compartment to the development of insulin resistance. Of note, the analysis of the metabolic phenotype of the TLR4-deficient mice could be complicated due to the potential compensatory increase in TLR2 expression (Ding et al., 2012).

TLR2 detects lipoproteins, lipoteichoic acid, and peptidoglycan from gram-positive bacteria and dimerizes with TLR1 and TLR6 (Mogensen, 2009). TLR2 has a broad pattern of expression and besides its expression in immune cells, is also expressed in insulin sensitive cells and islets (Ehshes et al., 2010). A role for TLR2 in the metabolic complications of obesity was suggested by its increased level in different metabolic tissues of obese mice and patients and in circulating monocytes of type 2 diabetic patients (Fresno et al., 2011; Könnner and Brüning, 2011). Like TLR4, TLR2 could be a sensor for saturated fatty acids mediating their pro-inflammatory effects in adipose tissue and macrophages and participating in the development of insulin resistance in cultured myotubes or adipocytes (Fresno et al., 2011; Könnner and Brüning, 2011). However, as for TLR4, a direct activation of TLR2 by saturated fatty acids has been questioned owing to possible contamination by LPS (Erridge and Samani, 2009). Thus, both TLR4 and TLR2 could participate in the sensing of abnormal levels of nutrients, especially fatty acids and in the detection of gut microflora modification in obesity (**Figure 1**). Cooperation between these two TLRs might be involved since

TLR4 activation increases the synthesis of TLR2 in adipocytes. This overlapping function could explain the similar metabolic phenotype of TLR4 and TLR2 deficient mice. Indeed, invalidation of TLR2 improved diet-induced insulin resistance and inflammation of adipose tissue, liver, or muscles (Caricilli et al., 2008; Kuo et al., 2011; Ehshes et al., 2010 #3013, Himes and Smith, 2010 #3010). Further, TLR2 signaling is involved in diet-induced pancreatic islet inflammation and beta-cell dysfunction (Ehshes et al., 2010). TLR2 knockout mice have also a reduced adiposity (Ehshes et al., 2010; Himes and Smith, 2010; Kuo et al., 2011) suggesting that the lack of TLR2 signaling could decrease lipid uptake or increase lipid oxidation in different tissues. Whether the effect of TLR2 activation on lipid metabolism is direct or the consequence of an inflammatory state remains to be clarified. However, the reported interaction between activated TLR2 and CD36, a transporter of fatty acids, supports a role for TLR2 signaling in fatty acids uptake in metabolic tissues (Triantafyllou et al., 2006).

Although the findings discussed above support a protective role of TLR2 inactivation in the context of obesity, a recent study reported that TLR2 knockout mice had a phenotype reminiscent of metabolic syndrome even on low-fat diet. In this setting, it was demonstrated that the gut microbiota was responsible for the development of insulin resistance (Caricilli et al., 2011). This finding illustrates the concept that complex interactions between environment, gut microbiota, and the genetic of the host drive the metabolic phenotype (Nicholson et al., 2012). In this regard, a specific environmental condition and the innate immune system may have shaped a harmful gut microbiota that overcomes the protective effect of the genetic deficiency in TLR2. Alternatively the loss of TLR in immune cells may alter gut microbiota leading to the development of inflammation, obesity, and insulin resistance as described for mice lacking TLR5 (Vijay-Kumar et al., 2010), a TLR highly expressed in the intestinal mucosa and involved in the detection of bacterial flagellin (Mogensen, 2009).

INFLAMMASOME AND NOD

Nucleotide oligomerization domain (NOD) 1 and 2 are intracellular proteins that recognize cell wall peptidoglycan moieties from gram-negative or gram-positive bacteria, respectively (Mogensen, 2009). NOD proteins have recently emerged as immune sensors involved in inflammation-induced insulin resistance (**Figure 1**). Peptidoglycan-induced activation of NOD1 in adipocytes or hepatocytes (Schertzer et al., 2011; Zhao et al., 2011) and NOD2 in muscle cells (Tamrakar et al., 2010) trigger insulin resistance through the production of inflammatory mediators and the activation of MAP kinases signaling leading to desensitization of IRS1 function. Injection of specific NOD1 ligand in mice promoted adipose tissue inflammation and induced whole-body insulin resistance with a strong decrease in insulin action in the liver. NOD2 ligand injection caused a milder insulin resistance and preferentially in muscles (Schertzer et al., 2011). NOD1-deficient mice, but not NOD2, were protected against glucose intolerance and diabetes induced by a high-fat diet (Amar et al., 2011). These studies demonstrate the ability of NOD activation to induce insulin resistance and support

the implication of NOD1 in the control of metabolic diseases through the sensing of components from gram-negative bacteria (**Figure 1**).

Inflammasomes are multi-protein complexes composed of three proteins: the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat (NLR) protein, the adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) and the caspase-1. Four different inflammasomes have been identified so far namely NLRP1, NLRP3, NLRC4, and AIM2. Pathogen and danger-associated signals activate inflammasomes leading to the processing of IL-1 β and IL-18 by caspase-1 (Mogensen, 2009). It is recognized that IL-1 β is one of the main cytokines implicated in the desensitization of insulin signaling (Lagathu et al., 2006; Jager et al., 2007) and its genetic invalidation protects mice against diet-induced insulin resistance (Stienstra et al., 2010; Wen et al., 2011). Pharmacological inhibition of IL-1 β signaling by the IL-1 receptor antagonist anakinra, mitigates inflammation, and improves glycemic control in type 2 diabetic patients (Larsen et al., 2007). With this in mind, several groups have investigated the implication of inflammasome activation in insulin resistance.

The expression of NLRP3 and caspase-1 is increased in adipose tissue of obese mice, overweight subjects, or obese individuals with type 2 diabetes (Stienstra et al., 2010; Koenen et al., 2011; Vandanmagsar et al., 2011). The identity of cells within the adipose tissue, in which the NLRP3 inflammasome is activated, remains controversial. Two studies reported an expression and activation mainly in adipose tissue macrophages with a low expression in adipocytes whereas Stienstra et al. found an important contribution of adipocytes (Stienstra et al., 2010; Vandanmagsar et al., 2011; Wen et al., 2011). However, invalidation of different components of the NLRP3 inflammasome (NLRP3, ASC, caspase-1) univocally protected the mice against high-fat diet-induced inflammation and insulin resistance. This phenotype was associated with a reduced expression of IL-1 β in adipose tissue and a reduced level of circulating IL-18 (Stienstra et al., 2010; Vandanmagsar et al., 2011; Wen et al., 2011). The lack of the NLRP3 inflammasome had consequences on the subset of immune cells within the adipose tissue. The number of M2 anti-inflammatory macrophages was increased in subcutaneous adipose tissue (SAT) and the activation of pro-inflammatory macrophages was dampened in visceral adipose tissue (VAT). In parallel, the number of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells was increased in SAT and the amount of effector memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells was decreased in VAT (Vandanmagsar et al., 2011). These findings suggest a model whereby the NLRP3 inflammasome-dependent production of IL-1 β and IL-18 by adipose tissue macrophages favors macrophage-T cell activation leading to a sustained inflammation of adipose tissue (Vandanmagsar et al., 2011). Besides its role in the control of adipose tissue inflammation, inflammasome activation in adipocytes could limit energy expenditure, fat oxidation, and adipogenesis as revealed by the phenotype of the caspase1^{-/-} mice (Stienstra et al., 2010, 2011). In addition to adipose tissue, activation of NLRP3-inflammasome in other tissues such as pancreatic islets has been reported (Zhou et al., 2010).

These findings strongly support a model whereby danger signals generated in obesity are detected by the NLRP3-inflammasome that in turn promotes inflammation and the dysfunction of different organs involved in the control of glucose and lipid homeostasis (**Figure 1**). The identity of the danger signals that activate the NLRP3 inflammasome in obesity remains ill-defined. However, the observation that the NLRP3 inflammasome is activated by fatty acids and ceramides suggests that the lipotoxic environment in obesity might trigger its activation (Vandanmagsar et al., 2011; Wen et al., 2011). However, the NLRP3 inflammasome can be activated by other molecules such as ATP, glucose, oxidized LDL, uric acid, and crystals of cholesterol. Since all of them are elevated in obesity, their respective contributions to the activation of inflammasome deserve further investigation. The common feature of these danger signals is their ability to increase ROS production that is prerequisite for NLRP3 inflammasome activation (Tschopp and Schroder, 2010). Thus, the activation of NLRP3 inflammasome in obesity might be related to the oxidative stress that develops in the different metabolic tissues. How NLRP3 inflammasome is activated by ROS is not completely understood but the thioredoxin-interacting protein (TXNIP) has recently emerged as a potential link with the demonstration of its binding with NLRP3 in a ROS sensitive manner leading to NLRP3 inflammasome activation (Zhou et al., 2010) (**Figure 1**). This function might explain the similar phenotype between TXNIP- and NLRP3-deficient mice when fed a high-fat diet (Zhou et al., 2010). Further TXNIP might also connect organelle stress, such as reticulum endoplasmic stress, to NLRP3 inflammasome activation (Osowski et al., 2012).

All together, these findings render the NLRP3 inflammasome as an attractive pharmacological target against the complications of obesity. In this multi-proteins complex, the easiest target is the caspase-1 since inhibitors already exist. The caspase-1 inhibitor Pralnacasan reduced body weight and improved insulin sensitivity of genetically obese *ob/ob* mice (Stienstra et al., 2010). However, one important caveat for the treatment of a chronic disease such as diabetes is that caspase-1 is involved in different inflammasome complexes and its inhibition may reduce the ability to fight infection.

Despite the potential role of the NLRP3 inflammasome in obesity-induced inflammation and insulin resistance, it remains to determine whether its activation is a primary event in the disease that drives the inflammation. Further, the relative contribution of NLRP3 inflammasome to the development of inflammation in the metabolic tissues and in the different subset of cells of these tissues should be clarified. The role of other inflammasome complexes also deserves investigation since ablation of NLRP3 markedly reduced but did not totally abrogate caspase-1 activation in adipose tissue or liver of obese mice (Vandanmagsar et al., 2011). Finally, other caspase-1 substrates besides IL-1 β and IL-18 might be involved in the deleterious effect of inflammasome activation on metabolic control. In this regard, the transcription factors SREBPs are activated by caspase-1 (Gurcel et al., 2006) and it was recently shown that SREBP-1a regulated the expression of inflammasome components in macrophages (Im et al., 2011). Thus, a feed-forward loop involving caspase-1 activation

and SREBP might link lipid metabolism to the inflammasome activation in obesity.

In conclusion, it is now recognized that the immune sensors described above (TLR, NOD, inflammasome) and others such as the pathogen-sensing kinase (PKR) (Nakamura et al., 2010) participate in the development of the metabolic inflammation. As recently discussed by Gregor and Hotamisligil in an outstanding review (Gregor and Hotamisligil, 2011), it is possible that in obesity the levels of nutrient intake may rise enough to stimulate pathogen- and danger-sensing pathways ultimately leading to the activation of immune cells in the different metabolic tissues. In other words, the organism, in over-feeding situation, recognizes the nutrients as harmful biological molecules and activates pathways that are usually engaged by pathogen or endogenous danger signals. In addition, modification of the gut microbiota and of the intestinal permeability in obesity may fuel the organism with inflammatory molecules such as LPS and other bacterial antigens or favor the translocation of commensal bacteria within metabolic tissues (Cani and Delzenne, 2009; Amar et al., 2011; Nicholson et al., 2012). As a consequence, inflammatory cytokines are overproduced and they activate different signaling pathways in metabolic cells that desensitize insulin signaling and alter the expression of proteins involved in glucose transporter trafficking (Kaddai et al., 2009).

INFLAMMATORY SIGNALING PATHWAYS INVOLVED IN THE DESENSITIZATION OF INSULIN ACTION

THE SOCS PROTEINS

The Suppressor of cytokine signaling (SOCS) protein family also named Janus family kinase-binding (JAB) proteins or SSI (signal transducer and activator of transcription induced Stat inhibitor) includes eight members (SOCS1–7 and CIS), which possess a SH2 domain, and a SOCS-box domain controlling the degradation of interacting proteins. They are induced by several inflammatory cytokines and are involved in a negative feedback loop leading to the termination of cytokines action. At the molecular level, the SOCS proteins interact with the tyrosine kinases Janus-activated kinases (JAK) or directly with the receptor of some cytokines, thus blocking the tyrosine phosphorylation of the transcription factors STAT for review see Lebrun and Van Obberghen (2008). Several cellular studies have demonstrated that SOCS negatively regulate the signaling pathway of hormones including leptin and insulin. In this regard, SOCS3 is induced by leptin and insulin and is involved in a negative feedback loop and in a cross-down regulation (Emanuelli et al., 2000; Lebrun and Van Obberghen, 2008; Benomar et al., 2009). SOCS1, SOCS6, and SOCS7 are also involved in the desensitization of insulin signaling. SOCS3 inhibits insulin signaling by a direct binding through its SH2 domain with the juxtamembrane phosphotyrosine 960 on the insulin receptor, thus preventing the interaction of IRS1 and 2 with the receptor (**Figure 2**). SOCS1 interacts with the catalytic domain of the insulin receptor which contains an interaction motif for IRS2, blocking thus more selectively the tyrosine phosphorylation of IRS2. SOCS1 and SOCS6 also inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor. It has also been shown that SOCS proteins interact with the tyrosine

phosphorylated IRS1 and IRS2 resulting in their ubiquitination and degradation by the proteasome (Lebrun and Van Obberghen, 2008) (**Figure 2**).

In obesity, inflammation leads to an up-regulation of SOCS proteins in hypothalamus, liver, muscles, and adipose tissue (Rieusset et al., 2004; Lebrun and Van Obberghen, 2008). A causal role for the up-regulation of SOCS proteins in the development of insulin resistance has been investigated in metabolic tissues. Overexpression of SOCS1 or SOCS3 in mouse liver or adipose tissue reduced the expression of IRS1 or IRS2 as well as their tyrosine phosphorylation induced by insulin. As a consequence insulin resistance developed in those tissues, as well as systemic insulin resistance for the overexpression in liver (Ueki et al., 2005; Shi et al., 2006a). Unexpectedly, overexpression of SOCS3 in adipose tissue protected the mice against systemic insulin resistance when fed a high-fat diet owing to a decrease in adipocyte hypertrophy (Shi et al., 2006a). Overexpression of SOCS3 in muscle exacerbated diet-induced obesity and insulin resistance but this effect was not due to a decreased insulin signaling but to an alteration in muscle integrity leading to a reduction in locomotor activity and energy expenditure (Lebrun et al., 2009).

The inhibition of SOCS proteins might thus be useful to prevent the development of obesity-induced insulin resistance. In agreement with such a possibility, heterozygous SOCS3 (SOCS3^{+/-}) mice or mice with targeted invalidation of SOCS3 in the central nervous system (CNS) were protected against diet-induced obesity and associated insulin resistance (Howard et al., 2004; Mori et al., 2004; Kievit et al., 2006). This phenotype was explained by increased leptin sensitivity and possibly by an effect on insulin action for the SOCS3^{+/-} mice (Howard et al., 2004). In the same way, targeted invalidation of SOCS3 in adipose tissue or in muscles protected mice against obesity-induced insulin resistance (Jorgensen et al., 2012; Palanivel et al., 2012). SOCS7-deficient mice also displayed improved glucose tolerance and insulin sensitivity (Banks et al., 2005). However, several considerations should be taken into account before inhibiting SOCS proteins for therapeutic purpose. First, some SOCS proteins positively regulate insulin action as demonstrated by the improved insulin sensitivity of SOCS6-overexpressing mice (Li et al., 2004). Second, given that SOCS proteins negatively regulate the signaling of inflammatory cytokines, their chronic inhibition might exacerbate inflammation that could counterbalance its beneficial effect on insulin sensitivity. This dual action of SOCS proteins is well-illustrated by differential effects of short- and long-term invalidation of SOCS1 or SOCS3 in liver. Short-term invalidation by antisense oligonucleotides in obese and diabetic *db/db* mice improved hepatic steatosis with a mild reduction in insulin resistance (Ueki et al., 2005). In contrast, while targeted deletion of SOCS3 in liver-enhanced liver insulin sensitivity on chow diet, it accelerated the onset of high-fat diet- or age-induced insulin resistance with an increased inflammation in liver (Torisu et al., 2007; Sachithanandan et al., 2010). This dual action is not restricted to SOCS3, since SOCS1 in immune cells limited the metabolic inflammation in liver and perhaps adipose tissue (Sachithanandan et al., 2011). Thus, the beneficial effect of SOCS1-deletion on insulin sensitivity

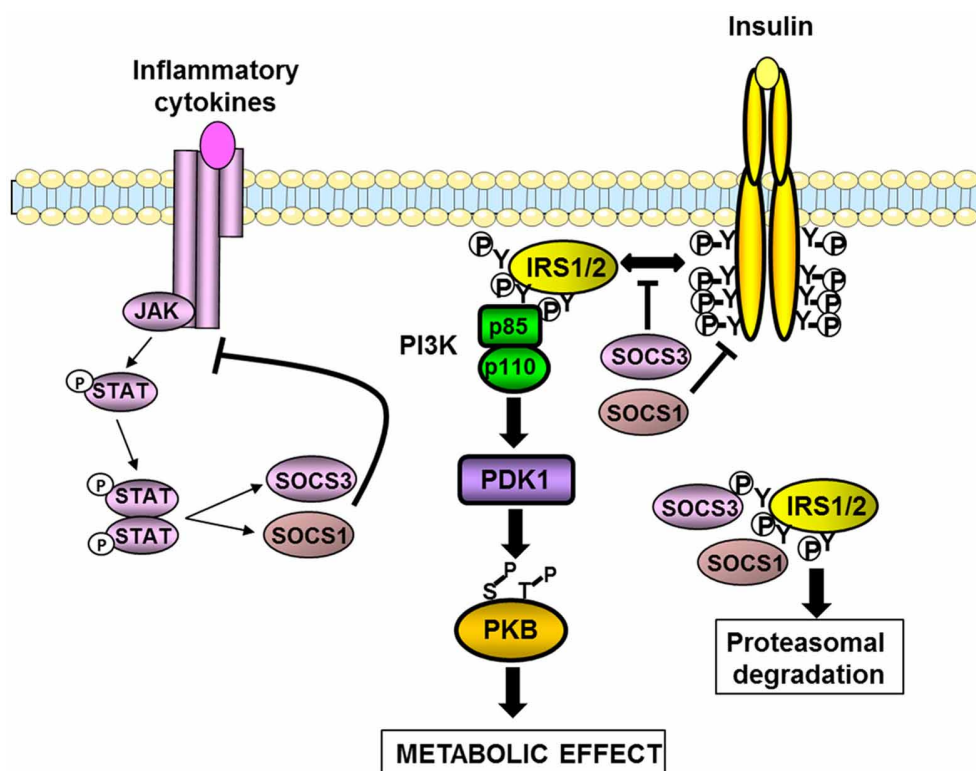


FIGURE 2 | Inhibition of insulin signaling pathway by SOCS1 and SOCS3. SOCS1 and SOCS3 are induced by cytokines and involved in a negative feed-back loop. SOCS1 and SOCS3 also inhibit insulin signaling by different mechanisms. They interfere with the binding between the insulin receptor and IRS1/2 proteins. SOCS1 also inhibits the tyrosine kinase activity

of the insulin receptor. Both SOCS1 and SOCS3 can interact with the tyrosine-phosphorylated IRS proteins leading to their degradation by the proteasome. The resulting effect is a decrease in the insulin-induced activation of the IRS1/2-PI3K-PKB axis leading to a reduction in the metabolic effects of insulin.

was only visible when SOCS1-deficient mice were crossed with interferon-gamma- or RAG2-deficient mice to limit inflammation. Of note, this beneficial effect was seen on chow diet (Jamieson et al., 2005; Emanuelli et al., 2008b) but was lost on a high-fat diet when the inflammation is enhanced (Emanuelli et al., 2008b). Further, SOCS2-deficient mice were protected against diet-induced hepatic steatosis probably due to an increase in the lipid mobilizing effect of growth hormone. However, this beneficial effect was overridden by a hyperproduction of inflammatory mediators by the resident macrophages leading to a higher level of inflammation in liver and adipose tissue and the worsening of insulin resistance (Zadjali et al., 2012).

In summary, it appears to date that SOCS3 is mainly involved in the regulation of energy balance through the down-regulation of leptin signaling whereas several SOCS such as SOCS1/3/6/7 are involved in the regulation of the insulin sensitivity. Since SOCS proteins contribute to the development of diet-induced obesity and insulin resistance, their targeting could be open new avenues for the treatment of metabolic disorders. However, careful examination of the balance between pro-inflammatory and insulin sensitizing effects of future inhibitors of SOCS proteins will be needed.

THE IKK β /NF- κ B AND JNK PATHWAYS IN INFLAMMATORY CYTOKINES PRODUCTION AND INSULIN RESISTANCE

The activity of both I κ B-kinase β (IKK β) and JNK is elevated in metabolic tissues in obesity, and these kinases are important nodes in the production of inflammatory mediators and in the desensitization of insulin signaling (Tanti and Jager, 2009; Solinas and Karin, 2010; Donath and Shoelson, 2011). JNK and IKK β are activated downstream of immune sensors such as TLRs and participate in the production of inflammatory cytokines via the transcription factors AP-1 and NF- κ B respectively (Figure 3). Many of the produced inflammatory cytokines are able to activate these two kinases leading to a feed-forward amplification loop (Donath and Shoelson, 2011; Gregor and Hotamisligil, 2011). Another important activator of these kinases is the endoplasmic reticulum (ER) stress (Figure 3).

ER stress occurs when the synthesis capacity of the ER is exceeded. In this case, the unfolded protein response (UPR) is activated in order to restore ER homeostasis. Three pathways are involved in the UPR, namely PERK (PKR-like eukaryotic initiation factor 2a), IRE-1 (inositol requiring enzyme 1), and ATF6 (activating transcription factor 6) pathways. If these mechanisms fail to restore proper ER homeostasis, cells undergo apoptosis (Xu et al., 2005). In a pioneer study, Hotamisligil and colleagues

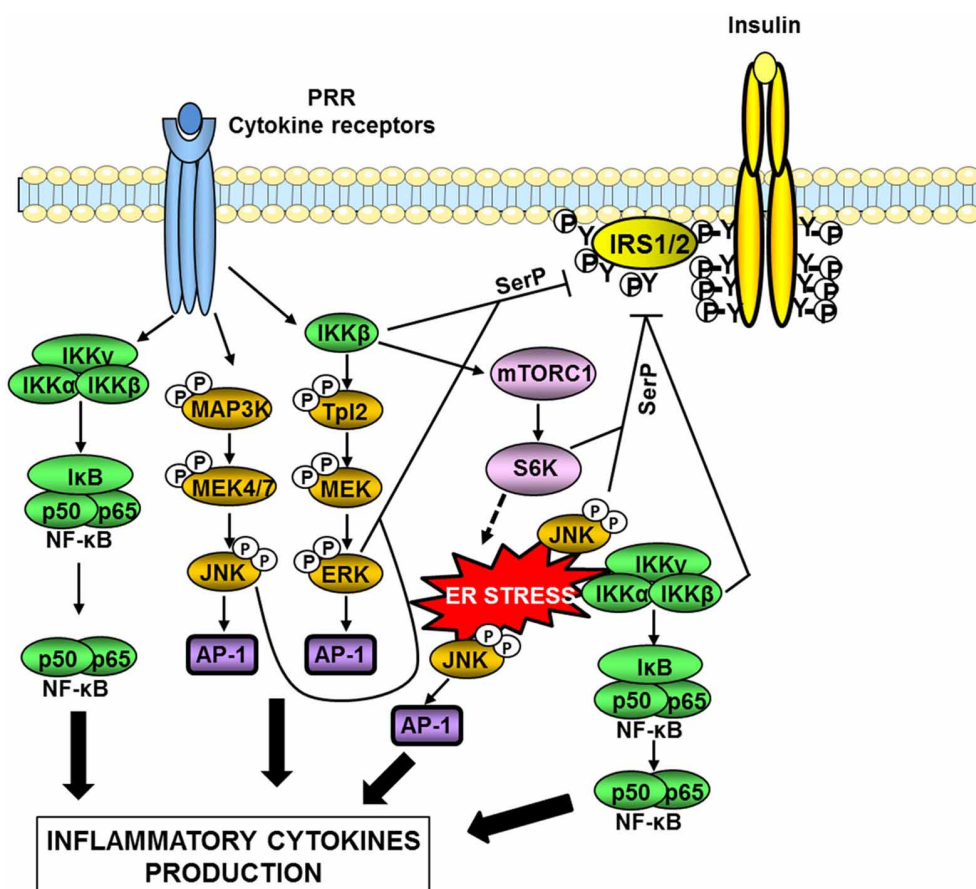


FIGURE 3 | Serine kinases involved in obesity-induced inflammation and insulin resistance. In obesity, a network of serine kinases is activated including IKK β , JNK, and ERK1/2. JNK and IKK β are activated downstream of pattern-recognition receptors (PRRs) such as TLRs or by ER stress. IKK β is also involved in the activation of the Tpl2/ERK pathway. These pathways participate in the production of inflammatory cytokines via the transcription factors AP-1 and NF- κ B. Many of the produced inflammatory

cytokines are able to activate these kinases leading to a feed-forward amplification loop. JNK and ERK1/2 are involved in the desensitization of insulin signaling through phosphorylation of IRS1/2 on inhibitory serine sites (SerP). IKK β can directly phosphorylate IRS1/2 on serine sites but can also act indirectly through activation of mTORC1/S6 kinase. Over-activation of the mTORC1/S6K pathway could promote ER stress leading to an amplification loop.

(Ozcan et al., 2004) have demonstrated that ER stress developed in liver and adipose tissue during obesity owing to nutrient overload and participated in the onset of insulin resistance. Several recent reviews have discussed in details the mechanisms linking ER stress to obesity-induced inflammation, insulin resistance, and alterations in tissue metabolism (Cnop et al., 2011; Gregor and Hotamisligil, 2011; Flamment et al., 2012). The activation of IKK β /NF- κ B and JNK by the IRE-1 arm of the UPR is one of these mechanisms (Gregor and Hotamisligil, 2011).

At the molecular level, one important mechanism by which IKK β and JNK attenuate insulin signaling is the phosphorylation of IRS proteins on inhibitory serine phosphorylation sites (Figure 3). The mechanism by which IRS phosphorylation regulates insulin signaling is complex and described in details in recent reviews (Gual et al., 2005; Boura-Halfon and Zick, 2009; Tanti and Jager, 2009; Copps and White, 2012). In physiological condition, insulin induces a time-controlled phosphorylation of both positive and inhibitory serine sites in IRS1 and IRS2

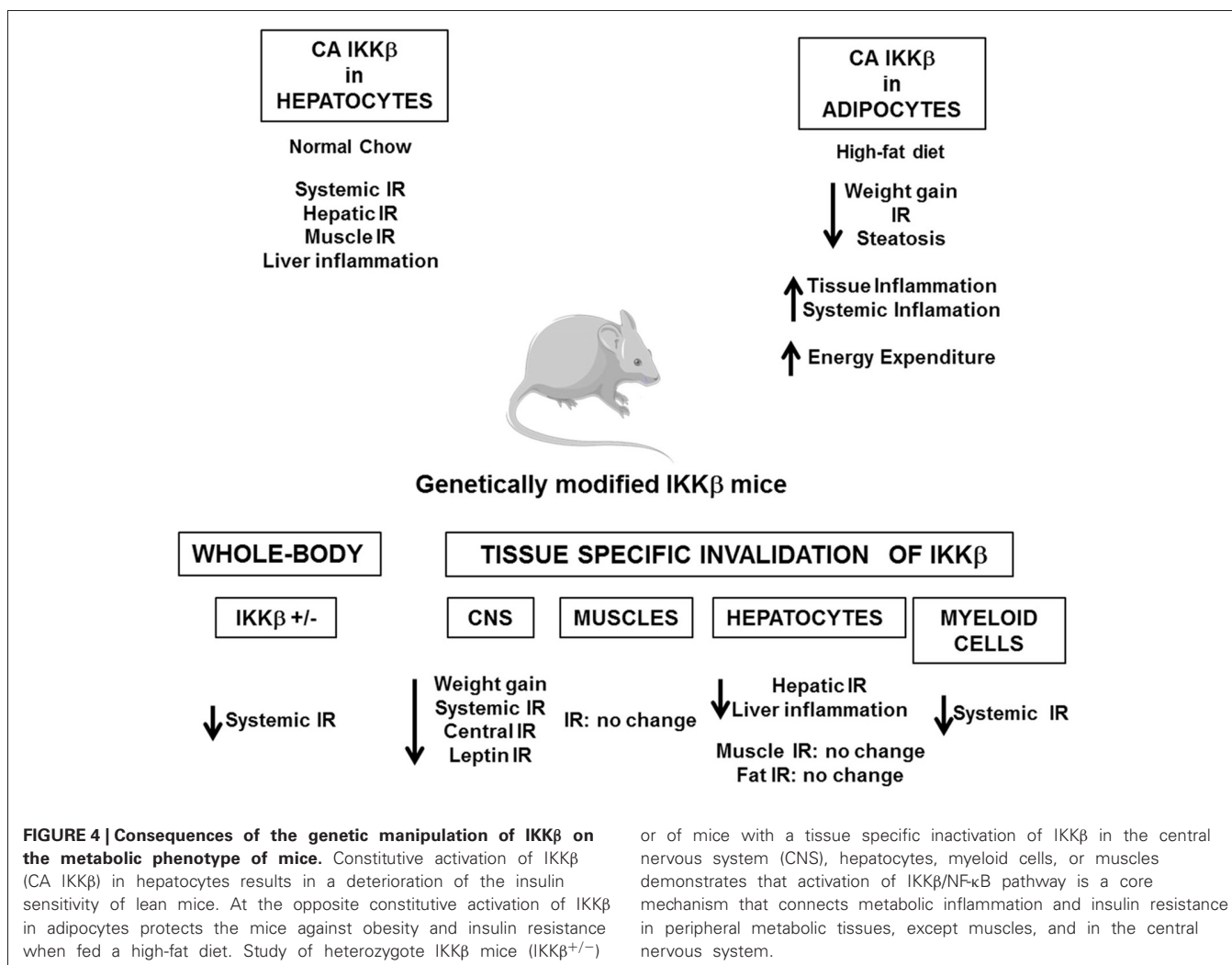
in order to ensure the fine tuning of IRS tyrosine phosphorylation that is necessary for the propagation of insulin action (Tanti and Jager, 2009; Copps and White, 2012). Since our pioneer study (Tanti et al., 1994), it is now admitted that during obesity, activation of inflammatory, and stress kinases such as JNK and IKK is responsible for an uncontrolled phosphorylation of IRS on inhibitory serine sites resulting in a decrease in IRS tyrosine phosphorylation and a desensitization of insulin signaling (Boura-Halfon and Zick, 2009; Tanti and Jager, 2009). It is noteworthy that JNK seems more involved in the direct IRS serine phosphorylation than IKK β (Tanti and Jager, 2009). IKK β activation could promote IRS1 serine phosphorylation through activation of TSC1/TSC2/mTORC1/S6 Kinase-1 pathway leading to inhibitory IRS1 serine phosphorylation by S6K1 (Lee et al., 2008). Of note, activation of mTORC1 by IKK β could be also involved in feed-forward mechanism induced by inflammatory cytokines to promote ER stress since over-activation of mTORC1 has been linked to the development of ER stress (Ozcan et al., 2008).

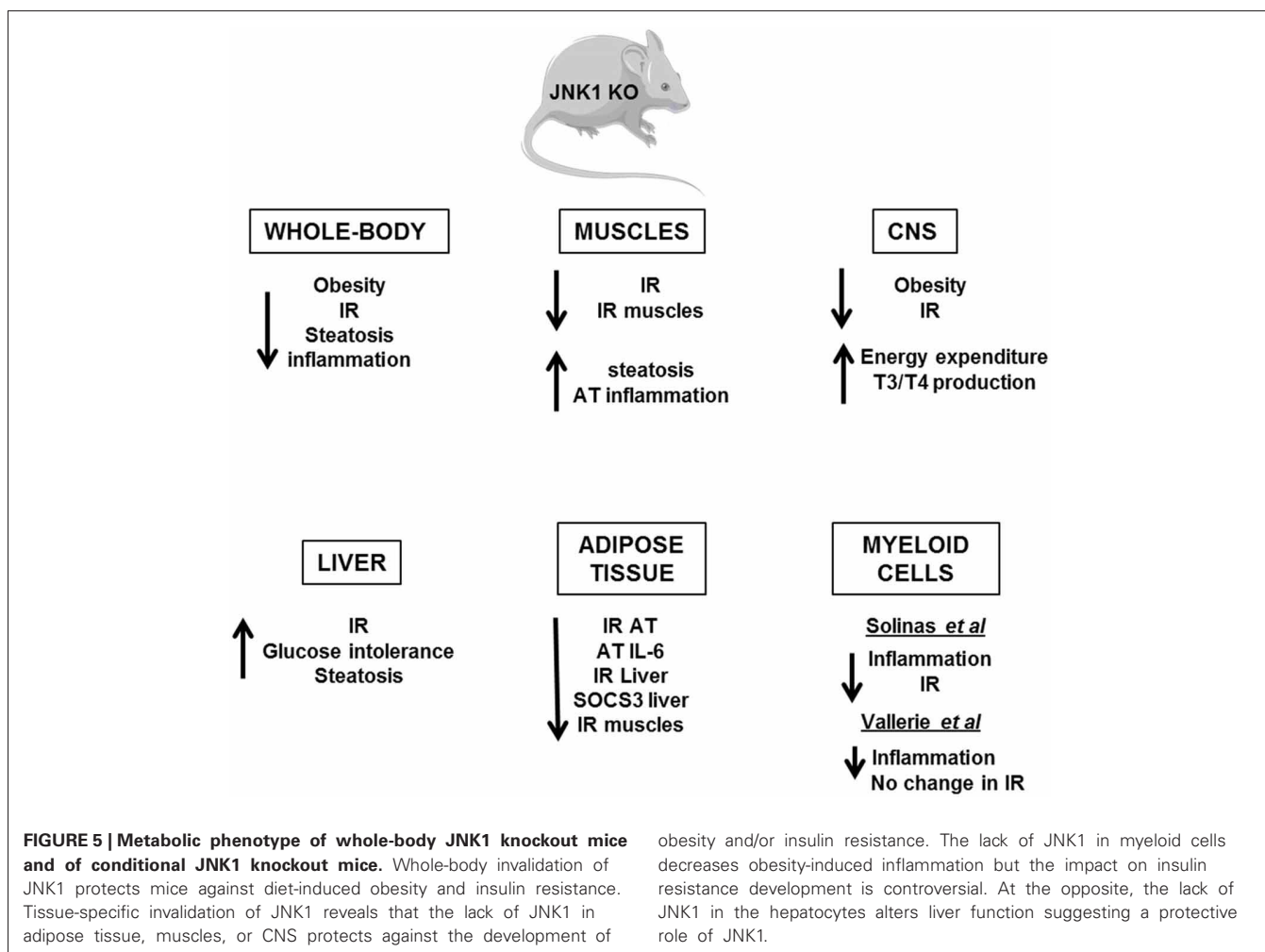
(Figure 3). In addition, activation of the IKK β /NF κ B pathway increases the expression of PTP1B, a tyrosine phosphatase that dephosphorylates IRS1 (Zabolotny et al., 2008).

Several *in vivo* studies in mice have demonstrated the importance of the IKK β /NF- κ B and JNK pathways in the development of insulin resistance (Figures 4, 5). Heterozygous IKK β and whole-body JNK1-deficient mice were partially protected against diet-induced insulin resistance (Yuan et al., 2001; Hirosumi et al., 2002). JNK2 could also play a role in insulin resistance but to a lesser extent (Tuncman et al., 2006). A cell-autonomous mechanism that involves the negative regulation of IRS1 function by serine phosphorylation was implicated in the regulation of insulin resistance induced by JNK1 and possibly by IKK β during obesity (Hirosumi et al., 2002; Sabio et al., 2010b). IKK β haplo-insufficiency or JNK1 invalidation could also reduce the pro-inflammatory effect of high-fat diet. In this regard, mice lacking IKK β or JNK1 in immune cells were partially protected against obesity-induced inflammation (Arkan et al., 2005; Solinas et al., 2007; Vallerie et al., 2008). However, if the protection against systemic insulin resistance was obvious for IKK β deletion (Arkan et al., 2005), contradictory results were reported for JNK1

invalidation (Solinas et al., 2007; Sabio et al., 2008; Vallerie et al., 2008).

The picture that emerges is that activation of these pathways in non-hematopoietic cells also participates in tissues inflammation and local or systemic insulin resistance. However, the consequences of IKK β and JNK activation on the development of insulin resistance could totally differ and depend on the site of action, the level of expression and the impact on adiposity. Indeed, the activation of IKK β /NF- κ B in hepatocytes-induced liver inflammation and insulin resistance (Arkan et al., 2005; Cai et al., 2005; Tamura et al., 2007; Wunderlich et al., 2008) and was associated with a reduced ability of insulin to suppress neoglucogenesis (Arkan et al., 2005) and with an increased production of VLDL leading to the development of hypertriglyceridemia (van Diepen et al., 2011). At the opposite of these findings, the development of inflammation induced by a moderate IKK β activation in adipose tissue and before the onset of obesity has been shown to be protective against diet-induced insulin resistance by limiting adipose tissue expansion and by increasing energy expenditure (Jiao et al., 2012). Furthermore, in contrast to the deleterious effect of IKK β , the activation of JNK pathway in liver





seems to have a protective role since hepatocyte-specific invalidation of JNK1 led to the development of glucose intolerance, insulin resistance, and liver steatosis even in lean mice (Sabio et al., 2009). This finding was quite unexpected given that the liver of obese whole-body JNK1-deficient mice was more insulin sensitive with less inflammation. Thus, it is possible that the inhibition of JNK1 in hepatocytes *per se* is detrimental whereas the combined inhibition of JNK1 in hepatocytes and in other liver cells of the liver has a protective effect. Further, organ to organ communication, especially cross-talk between liver and adipose tissue, could be another explanation since JNK1 invalidation in adipose tissue ameliorated liver insulin sensitivity (Sabio et al., 2008; Zhang et al., 2011). One important mediator of this cross-talk could be the adipocytokines, especially IL-6, which altered liver insulin sensitivity through induction of SOCS3 (Sabio and Davis, 2010). The consequences of JNK1 or IKK β activation in muscles are also totally different. While inactivation of IKK β in cultured muscle cells markedly reduced cytokine-induced insulin resistance (Austin et al., 2008), the study of mice with conditional knockout of IKK β in muscles argues against a major role of muscular IKK β activation in obesity-associated insulin resistance (Rohl et al., 2004). Muscle-specific invalidation of JNK1

improved high-fat diet-induced muscles insulin resistance but also led to an enhanced liver steatosis and to a mild increase in inflammatory mediator expression in adipose tissue. The cross-talk between these different organs was mediated by an increase in circulating triglycerides owing to a reduction in lipoprotein lipase expression in muscles (Sabio et al., 2010b). Systemic insulin sensitivity was slightly improved in those mice suggesting that the improved insulin sensitivity in muscles was sufficient to overcome the enhanced liver steatosis and adipose tissue inflammation. However, it is possible that with age, a worsening in insulin sensitivity develops.

Several evidences suggest that activation of IKK β and JNK pathways in the hypothalamus by over-nutrition contributes to energy imbalance and weight gain in addition to their role in the development of insulin resistance. At the molecular level, ER stress that develops in hypothalamus owing to an oversupply in nutrients activates the IKK β /NF- κ B pathway leading to local SOCS3 expression that interferes with both insulin and leptin signaling (Zhang et al., 2008). The mechanism by which JNK1 activation in the nervous system regulates body mass is different and complex. Two studies have revealed that invalidation of JNK1 in the nervous system markedly enhanced the

production of thyroid hormones through the hypothalamic-pituitary-thyroid axis leading to an increase in energy expenditure and a protection against obesity (Belgardt et al., 2010; Sabio et al., 2010a).

These studies support the idea that the over-activation of IKK β /NF- κ B and JNK pathways is a core mechanism that connects metabolic inflammation and insulin resistance both in peripheral tissues and in the CNS. This central role highlights IKK β and JNK as potential pharmacological targets against the development of insulin resistance. In this regard, Shoelson and colleagues have shown that high-doses of salicylate and its derivative salsalate were able to inhibit IKK β activity and to improve insulin sensitivity in obese mice (Donath and Shoelson, 2011). Importantly, recent proof of concept studies and clinical trials in type 2 diabetic patients suggest that salsalate ameliorates glucose tolerance through better insulin sensitivity, and/or *via* an increased insulin secretion (Koska et al., 2009; Goldfine et al., 2010). The consequences of the pharmacological targeting of JNK have been studied only in mice. Competitive inhibitors of ATP directed against JNK and specific small substrate-competitive inhibitors of JNK displayed protective effects against diet-induced insulin resistance and/or weight gain (Bogoyevitch and Arthur, 2008; Cho et al., 2008; Yang and Trevillyan, 2008). These results suggest that IKK β or JNK inhibitors could be interesting therapeutic agents against insulin resistance and type 2 diabetes. However, it should be kept in mind that IKK β /NF- κ B pathway is a central regulator of immunity and that JNK pathway regulates numerous physiologic processes. Chronic inhibition of these pathways might thus have side effects and favor the emergence of other pathologies.

THE EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASES IN OBESITY DEVELOPMENT AND INSULIN RESISTANCE

The Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK) 1/2 (also known as p44 and p42 MAP kinase) are activated by several growth factors but also by inflammatory cytokines. The activation of ERK1/2 requires the phosphorylation of both tyrosine and threonine residues located in a TERY sequence. This phosphorylation is mediated by the MAP kinase kinase (MAP2K) MEK. The activation of MEK also requires its phosphorylation by MAP kinase kinase kinase (MAP3K). Depending on the stimuli, different MAP3Ks are engaged to phosphorylate MEK. The activated ERK1/2 phosphorylates numerous substrates with serine or threonine residues close to a proline residue (Keshet and Seger, 2010). The activity of ERK1/2 is increased in adipose tissue, liver, and muscles of obese/diabetic patients or mice for review see Tanti and Jager (2009). Several cellular studies have shown that activation of ERK1/2 by diabetogenic factors-induced IRS1 serine phosphorylation. These phosphorylation events decrease the interaction between IRS1 and the PI3K or inhibit the association between IRS1 and the insulin receptor and would thus diminish the metabolic effects of insulin (Tanti and Jager, 2009). This mechanism has relevant implications in human pathology since basal ERK activity and IRS1 phosphorylation are abnormally increased in primary muscle cells from type 2 diabetic patients (Bouzakri et al., 2003). In addition, activation of the ERK pathway by the inflammatory cytokines, especially IL-1 β , in

adipocytes also induced a decrease in the transcription of IRS-1 mRNA, leading to a decrease in insulin signaling and glucose transport (Jager et al., 2007). ERK activation by inflammatory cytokines could also indirectly promote insulin resistance by the stimulation of adipocyte lipolysis and the release of free fatty acids (Souza et al., 2003).

The contribution of ERK pathway in the development of obesity and insulin resistance was first demonstrated by our study of ERK1-deficient mice (Bost et al., 2005). Those mice were protected against obesity when fed a high-fat diet, because of a decrease in adipogenesis and an increase in postprandial energy expenditure. The lack of obesity was associated with a better glucose and insulin tolerance compared to wild-type mice (Bost et al., 2005). Conversely, over-activation of the ERK pathway owing to deletion of the signaling adapter p62 resulted in the development of mature-onset obesity and insulin resistance with reduced energy expenditure and increased adipogenesis (Rodriguez et al., 2006). This phenotype was probably due to the over-activation of ERK1 rather than ERK2 since deletion of ERK1 in the p62^{-/-} genetic background reversed the phenotype (Lee et al., 2010). Those studies clearly highlighted the role of ERK1 in the development of obesity but did not allow concluding whether ERK1 could modulate the insulin sensitivity independently of its effect on body weight. However, we have recently shown that invalidation of ERK1 protected obese *ob/ob* mice against insulin resistance and adipose tissue inflammation without any changes in obesity (Jager et al., 2011). Another study also suggested that inhibition of ERK had beneficial effects on insulin resistance independently of an effect on body weight gain (Emanuelli et al., 2008a).

The pharmacological targeting of ERK1/2 against insulin resistance could have a series of drawbacks since they are involved in numerous biological processes. A possible alternative choice would be to target proteins which control ERK activity, specifically in response to inflammatory stresses which develop during obesity. In this regard, interesting candidates could be specific MAP3 kinases that are important in innate immune receptor signaling to MAP kinase activation (Symons et al., 2006).

Among the different MAP3K that control ERK activity, our team recently identified the kinase Tpl2 (Tumor progression locus, MAP3K8) as a potential new player in adipose tissue dysfunction and inflammation (Jager et al., 2010). In immune cells, Tpl2 plays an important role in the production of inflammatory cytokines, especially TNF α (Dumitru et al., 2000), and it is also involved in cytokines signaling downstream of innate immunoreceptors (Gantke et al., 2011). The importance of Tpl2 in inflammation has been demonstrated by the resistance to endotoxin shock and the lack of TNF- α production by macrophages of the Tpl2-deficient mice (Dumitru et al., 2000). Further, Tpl2 is a critical regulator of pancreatic, lung, and bowel inflammation in mice (Gantke et al., 2011). In non-stimulated cells, Tpl2 binds in its inactive form to p105NF- κ B and is activated by different inflammatory stimuli through phosphorylation and degradation of p105NF- κ B induced by IKK β (Gantke et al., 2011). Among them, LPS, TNF- α , IL-1 β , and CD40 are involved in obesity-induced inflammation and insulin resistance (Poggi et al., 2009; Tanti and Jager, 2009) suggesting a potential role for Tpl2 in this

pathology. Recently, we found Tpl2 up-regulated in adipose tissue of obese mice and patients. Tpl2 was involved in the lipolytic effect the inflammatory cytokines and in the serine phosphorylation of IRS1 in adipocytes (Jager et al., 2010). Based on these findings, one can hypothesize that the targeting of Tpl2 could have beneficial effects in the context of obesity by reducing the production of inflammatory cytokines by adipose tissue immune cells and by blocking their deleterious effects in adipocytes. In agreement, one recent study has shown that Tpl2 inactivation protected the mice against insulin resistance with a reduction in liver and adipose tissue inflammation (Perfield et al., 2011). However, another study failed to confirm this finding (Lancaster et al., 2012). Thus, further studies are needed to conclude whether the targeting of Tpl2 could improve the complications of obesity.

CONCLUSION

The discovery that metabolic diseases are associated with a low-grade inflammatory state has opened a new area of research to understand how inflammation develops and how it impact on metabolic pathways. It appears that a cross-talk between immune cells and metabolic cells plays a central role in the disturbance of metabolic homeostasis. High levels of dietary saturated fatty acids or of their metabolites can be detected by immune sensors such as TLR or inflammasome leading to the synthesis of inflammatory cytokines in different metabolic tissues. Dietary fat

can also modify the intestinal microbiota that produces different inflammatory molecules leading to an inappropriate immune reaction. The inflammatory cytokines, saturated fatty acids, and LPS activate a network of signaling pathways that impinges on insulin signaling leading to alterations in metabolic cell functions. Hence, the importance of immune sensors and of different kinases suggests that new strategies targeting these proteins could be conceived to improve the metabolic complications of obesity.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Mireille Cormont and Yannick Le Marchand-Brustel for helpful suggestions and critical reading of the manuscript. We would like to apologize to colleagues for works which were not cited due to space limitation.

Author's work was supported by INSERM and CNRS and the University of Nice- Sophia Antipolis (France). Jean-François Tanti acknowledges support from ALFEDIAM-Abbott Laboratory, the French National Research Agency (grant ANR-2010-BLAN-1117-01) and the European Commission (Brussels, Belgium) (Contract LSHM-CT-2005-018734, Hepatic and Adipose Tissue and Functions in the Metabolic Syndrome, HEPADIP). Franck Ceppo is supported by a fellowship from the Region Provence Alpes-Cote d'Azur. Flavien Berthou is supported by the ANR grant ANR-2010-BLAN-1117-01.

REFERENCES

- Amar, J., Chabo, C., Waget, A., Klopp, P., Vachoux, C., Bermudez-Humaran, L. G., et al. (2011). Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol. Med.* 3, 559–572.
- Arkan, M. C., Hevener, A. L., Greten, F. R., Maeda, S., Li, Z. W., Long, J. M., et al. (2005). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 11, 191–198.
- Austin, R. L., Rune, A., Bouzakri, K., Zierath, J. R., and Krook, A. (2008). siRNA-mediated reduction of inhibitor of nuclear factor-kappaB kinase prevents tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetes* 57, 2066–2073.
- Banks, A., Li, J., McKeag, L., Hribal, M., Kashiwada, M., Accili, D., et al. (2005). Deletion of SOCS7 leads to enhanced insulin action and enlarged islets of Langerhans. *J. Clin. Invest.* 115, 2462–2471.
- Belgardt, B. F., Mauer, J., Wunderlich, F. T., Ernst, M. B., Pal, M., Spohn, G., et al. (2010). Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 6028–6033.
- Benomar, Y., Berthou, F., Vacher, C. M., Bailleux, V., Gertler, A., Djiane, J., et al. (2009). Leptin but not ciliary neurotrophic factor (CNTF) induces phosphotyrosine phosphatase-1B expression in human neuronal cells (SH-SY5Y): putative explanation of CNTF efficacy in leptin-resistant state. *Endocrinology* 150, 1182–1191.
- Bertola, A., Ciucci, T., Rousseau, D., Bourlier, V., Duffaut, C., Bonnafous, S., et al. (2012). Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes* 61, 2238–2247.
- Bogoyevitch, M. A., and Arthur, P. G. (2008). Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JuNK no more? *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 76–93.
- Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., Even, P., Belmonte, N., Prot, M., et al. (2005). The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for *in vitro* and *in vivo* adipogenesis. *Diabetes* 54, 402–411.
- Boura-Halfon, S., and Zick, Y. (2009). Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E581–E591.
- Bouzakri, K., Roques, M., Gual, P., Espinosa, S., Guebre-Egziabher, F., Riou, J. P., et al. (2003). Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 1319–1325.
- Burcelin, R., Serino, M., Chabo, C., Blasco-Baque, V., and Amar, J. (2011). Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetol.* 48, 257–273.
- Cai, D., Yuan, M., Frantz, D. F., Melendez, P. A., Hansen, L., Lee, J., et al. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat. Med.* 11, 183–190.
- Cani, P. D., and Delzenne, N. M. (2009). The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1546–1558.
- Caricilli, A., Picardi, P., de Abreu, L. L., Ueno, M., Prada, P., Ropelle, E., et al. (2011). Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS Biol.* 9:e1001212. doi: 10.1371/journal.pbio.1001212
- Caricilli, A. M., Nascimento, P. H., Pauli, J. R., Tsukumo, D. M., Velloso, L. A., Carvalheira, J. B., et al. (2008). Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. *J. Endocrinol.* 199, 399–406.
- Cho, H., Black, S. C., Looper, D., Shi, M., Kelly-Sullivan, D., Timofeevski, S., et al. (2008). Pharmacological characterization of a small molecule inhibitor of c-Jun kinase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E1142–E1151.
- Cnop, M., Foufelle, F., and Velloso, L. A. (2011). Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol. Med.* 18, 59–68.
- Coenen, K., Gruen, M., Lee-Young, R., Puglisi, M., Wasserman, D., and Hastay, A. (2009). Impact of macrophage toll-like receptor 4 deficiency on macrophage infiltration into adipose tissue and the artery wall in mice. *Diabetologia* 52, 318–328.
- Copps, K. D., and White, M. F. (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* 55, 2565–2582.
- Davis, J. E., Gabler, N. K., Walker-Daniels, J., and Spurlock, M. E. (2008). Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring)* 16, 1248–1255.

- Ding, Y., Subramanian, S., Montes, V., Goodspeed, L., Wang, S., Han, C., et al. (2012). Toll-like receptor 4 deficiency decreases atherosclerosis but does not protect against inflammation in obese low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1596–1604.
- Donath, M. Y., and Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 98–107.
- Dumitru, C. D., Ceci, J. D., Tsatsanis, C., Kontoyiannis, D., Stamatakis, K., Lin, J. H., et al. (2000). TNF- α induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 103, 1071–1083.
- Ehses, J., Meier, D., Wueest, S., Rytka, J., Boller, S., Wieling, P., et al. (2010). Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet. *Diabetologia* 53, 1795–1806.
- Emanuelli, B., Eberle, D., Suzuki, R., and Kahn, C. R. (2008a). Overexpression of the dual-specificity phosphatase MKP-4/DUSP-9 protects against stress-induced insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 3545–3550.
- Emanuelli, B., Macotela, Y., Boucher, J., and Ronald Kahn, C. (2008b). SOCS-1 deficiency does not prevent diet-induced insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 447–452.
- Emanuelli, B., Peraldi, P., Filloux, C., Sawka-Verhelle, D., Hilton, D., and Van Obberghen, E. (2000). SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 275, 15985–15991.
- Erridge, C., and Samani, N. J. (2009). Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1944–1949.
- Fischer, H., Ellstrom, P., Ekstrom, K., Gustafsson, L., Gustafsson, M., and Svanborg, C. (2007). Ceramide as a TLR4 agonist: a putative signalling intermediate between sphingolipid receptors for microbial ligands and TLR4. *Cell. Microbiol.* 9, 1239–1251.
- Flamment, M., Hajdich, E., Ferre, P., and Foufelle, F. (2012). New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 381–390.
- Fresno, M., Alvarez, R., and Cuesta, N. (2011). Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. *Arch. Physiol. Biochem.* 117, 151–164.
- Gantke, T., Sriskantharajah, S., and Ley, S. C. (2011). Regulation and function of TPL-2, an I κ B kinase-regulated MAP kinase kinase. *Cell Res.* 21, 131–145.
- Goldfine, A. B., Fonseca, V., Jablonski, K. A., Pyle, L., Staten, M. A., and Shoelson, S. E. (2010). The effects of salsalate on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 152, 346–357.
- Gregor, M. F., and Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 415–445.
- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J. F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signalling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87, 99–109.
- Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J., and van der Goot, F. G. (2006). Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* 126, 1135–1145.
- Himes, R., and Smith, C. (2010). Tlr2 is critical for diet-induced metabolic syndrome in a murine model. *FASEB J.* 24, 731–739.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., et al. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333–336.
- Howard, J. K., Cave, B. J., Oksanen, L. J., Tzameli, I., Bjorbaek, C., and Flier, J. S. (2004). Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat. Med.* 10, 734–738.
- Im, S. S., Yousef, L., Blaschitz, C., Liu, J. Z., Edwards, R. A., Young, S. G., et al. (2011). Linking lipid metabolism to the innate immune response in macrophages through sterol regulatory element binding protein-1a. *Cell Metab.* 13, 540–549.
- Jager, J., Corcelle, V., Gremeaux, T., Laurent, K., Waget, A., Pages, G., et al. (2011). Deficiency in the extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) protects leptin-deficient mice from insulin resistance without affecting obesity. *Diabetologia* 54, 180–189.
- Jager, J., Gremeaux, T., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J. F. (2007). Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 148, 241–251.
- Jager, J., Gremeaux, T., Gonzalez, T., Bonnafous, S., Debar, C., Laville, M., et al. (2010). The Tpl2 kinase is up-regulated in adipose tissue in obesity and may mediate IL-1 (Minamino et al.) and TNF- α effects on ERK activation and lipolysis. *Diabetes* 59, 61–70.
- Jamieson, E., Chong, M., Steinberg, G., Jovanovska, V., Fam, B., Bullen, D., et al. (2005). Socs1 deficiency enhances hepatic insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 31516–31521.
- Jiao, P., Feng, B., Ma, J., Nie, Y., Paul, E., Li, Y., et al. (2012). Constitutive activation of IKK β in adipose tissue prevents diet-induced obesity in mice. *Endocrinology* 153, 154–165.
- Jorgensen, S., O'Neill, H., Sylow, L., Honeyman, J., Hewitt, K., Palanivel, R., et al. (2012). Deletion of skeletal muscle SOCS3 prevents insulin resistance in obesity. *Diabetes* 62, 56–64.
- Kaddai, V., Jager, J., Gonzalez, T., Najem-Lendom, R., Bonnafous, S., Tran, A., et al. (2009). Involvement of TNF- α in abnormal adipocyte and muscle sortilin expression in obese mice and humans. *Diabetologia* 52, 932–940.
- Keshet, Y., and Seger, R. (2010). The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol. Biol.* 661, 3–38.
- Kievit, P., Howard, J., Badman, M., Balthasar, N., Coppari, R., Mori, H., et al. (2006). Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells. *Cell Metab.* 4, 123–132.
- Kim, F., Pham, M., Luttrell, I., Bannerman, D. D., Tupper, J., Thaler, J., et al. (2007). Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ. Res.* 100, 1589–1596.
- Kleinridders, A., Schenten, D., Könnner, A., Belgard, B., Mauer, J., Okamura, T., et al. (2009). MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell Metab.* 10, 249–259.
- Koenen, T. B., Stienstra, R., van Tits, L. J., Joosten, L. A., van Velzen, J. F., Hijmans, A., et al. (2011). The inflammasome and caspase-1 activation: a new mechanism underlying increased inflammatory activity in human visceral adipose tissue. *Endocrinology* 152, 3769–3778.
- Könnner, A., and Brüning, J. (2011). Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 16–23.
- Koska, J., Ortega, E., Bunt, J. C., Gasser, A., Impson, J., Hanson, R. L., et al. (2009). The effect of salsalate on insulin action and glucose tolerance in obese non-diabetic patients: results of a randomised double-blind placebo-controlled study. *Diabetologia* 52, 385–393.
- Kuo, L. H., Tsai, P. J., Jiang, M. J., Chuang, Y. L., Yu, L., Lai, K. T. A., et al. (2011). Toll-like receptor 2 deficiency improves insulin sensitivity and hepatic insulin signalling in the mouse. *Diabetologia* 54, 168–179.
- Lagathu, C., Yvan-Charvet, L., Bastard, J. P., Maachi, M., Quignard-Boulange, A., Capeau, J., et al. (2006). Long-term treatment with interleukin-1 β induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia* 49, 2162–2173.
- Lancaster, G. I., Kowalski, G. M., Estevez, E., Kraakman, M. J., Grigoriadis, G., Febrario, M. A., et al. (2012). Tumor progression locus 2 (Tpl2) deficiency does not protect against obesity-induced metabolic disease. *PLoS ONE* 7:e39100. doi: 10.1371/journal.pone.0039100
- Larsen, C. M., Faulenbach, M., Vaag, A., Volund, A., Ehses, J. A., Seifert, B., et al. (2007). Interleukin-1 receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 356, 1517–1526.
- Lebrun, P., Cognard, E., Bellon-Paul, R., Gontard, P., Filloux, C., Jehl-Pietri, C., et al. (2009). Constitutive expression of suppressor of cytokine signalling-3 in skeletal muscle leads to reduced mobility and overweight in mice. *Diabetologia* 52, 2201–2212.
- Lebrun, P., and Van Obberghen, E. (2008). SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiol. (Oxf.)* 192, 29–36.
- Lee, D. F., Kuo, H. P., Chen, C. T., Wei, Y., Chou, C. K., Hung, J. Y., et al. (2008). IKK β suppression of TSC1 function links the mTOR pathway with insulin resistance. *Int. J. Mol. Med.* 22, 633–638.
- Lee, S. J., Pfluger, P. T., Kim, J. Y., Nogueiras, R., Duran, A., Pages, G., et al. (2010). A functional role for the p62-ERK1 axis in the control of energy homeostasis and adipogenesis. *EMBO Rep.* 11, 226–232.
- Li, L., Chen, L., Hu, L., Liu, Y., Sun, H.-Y., Tang, J., et al. (2011). Nuclear factor high-mobility group box1 mediating the activation of Toll-like receptor 4 signaling in hepatocytes in the early stage of

- nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology* 54, 1620–1630.
- Li, L., Grønning, L., Anderson, P., Li, S., Edvardsen, K., Johnston, J., et al. (2004). Insulin induces SOCS-6 expression and its binding to the p85 monomer of phosphoinositide 3-kinase, resulting in improvement in glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 279, 34107–34114.
- Lolmede, K., Duffaut, C., Zakaroff-Girard, A., and Bouloumie, A. (2011). Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders. *Diabetes Metab.* 37, 283–290.
- Milanski, M., Degasperis, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D., et al. (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J. Neurosci.* 29, 359–370.
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 240–273.
- Mori, H., Hanada, R., Hanada, T., Aki, D., Mashima, R., Nishinakamura, H., et al. (2004). Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat. Med.* 10, 739–743.
- Nakamura, T., Furuhashi, M., Li, P., Cao, H., Tuncman, G., Sonenberg, N., et al. (2010). Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell* 140, 338–348.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., et al. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336, 1262–1267.
- Orr, J., Puglisi, M., Ellacott, K., Lumeng, C., Wasserman, D., and Hasty, A. (2012). Toll-like receptor 4 deficiency promotes the alternative activation of adipose tissue macrophages. *Diabetes* 61, 2718–2727.
- Osowski, C. M., Hara, T., O'Sullivan-Murphy, B., Kanekura, K., Lu, S., Hara, M., et al. (2012). Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced beta cell death through initiation of the inflammasome. *Cell Metab.* 16, 265–273.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., et al. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457–461.
- Ozcan, U., Ozcan, L., Yilmaz, E., Duvel, K., Sahin, M., Manning, B. D., et al. (2008). Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis. *Mol. Cell* 29, 541–551.
- Pal, D., Dasgupta, S., Kundu, R., Maitra, S., Das, G., Mukhopadhyay, S., et al. (2012). Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 18, 1279–1285.
- Palanivel, R., Fullerton, M., Galic, S., Honeyman, J., Hewitt, K., Jorgensen, S., et al. (2012). Reduced Socs3 expression in adipose tissue protects female mice against obesity-induced insulin resistance. *Diabetologia* 55, 3083–3093.
- Perfield, J. W. 2nd., Lee, Y., Shulman, G. I., Samuel, V. T., Jurczak, M. J., Chang, E., et al. (2011). Tumor progression locus 2 (TPS2) regulates obesity-associated inflammation and insulin resistance. *Diabetes* 60, 1168–1176.
- Poggi, M., Bastelica, D., Gual, P., Iglesias, M., Gremeaux, T., Knauf, C., et al. (2007). C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 50, 1267–1276.
- Poggi, M., Jager, J., Paulmyer-Lacroix, O., Peiretti, F., Gremeaux, T., Verdier, M., et al. (2009). The inflammatory receptor CD40 is expressed on human adipocytes: contribution to crosstalk between lymphocytes and adipocytes. *Diabetologia* 52, 1152–1163.
- Radin, M., Sinha, S., Bhatt, B., Dedousis, N., and O'Doherty, R. (2008). Inhibition or deletion of the lipopolysaccharide receptor Toll-like receptor-4 confers partial protection against lipid-induced insulin resistance in rodent skeletal muscle. *Diabetologia* 51, 336–346.
- Regazzetti, C., Peraldi, P., Gremeaux, T., Najem-Lendom, R., Ben-Sahra, I., Cormont, M., et al. (2009). Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes* 58, 95–103.
- Rieusset, J., Bouzakri, K., Chevillotte, E., Ricard, N., Jacquet, D., Bastard, J. P., et al. (2004). Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53, 2232–2241.
- Rodriguez, A., Duran, A., Selloum, M., Champy, M.-F., Diez-Guerra, F. J., Flores, J. M., et al. (2006). Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab.* 3, 211–222.
- Rohl, M., Pasparakis, M., Baudler, S., Baumgartl, J., Gautam, D., Huth, M., et al. (2004). Conditional disruption of IkappaB kinase 2 fails to prevent obesity-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 113, 474–481.
- Saberi, M., Woods, N. B., de Luca, C., Schenk, S., Lu, J. C., Bandyopadhyay, G., et al. (2009). Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. *Cell Metab.* 10, 419–429.
- Sabio, G., Cavanagh-Kyros, J., Barrett, T., Jung, D. Y., Ko, H. J., Ong, H., et al. (2010a). Role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in metabolic regulation by JNK1. *Genes Dev.* 24, 256–264.
- Sabio, G., Kennedy, N. J., Cavanagh-Kyros, J., Jung, D. Y., Ko, H. J., Ong, H., et al. (2010b). Role of muscle c-Jun NH2-terminal kinase 1 in obesity-induced insulin resistance. *Mol. Cell Biol.* 30, 106–115.
- Sabio, G., Cavanagh-Kyros, J., Ko, H. J., Jung, D. Y., Gray, S., Jun, J. Y., et al. (2009). Prevention of steatosis by hepatic JNK1. *Cell Metab.* 10, 491–498.
- Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J. Y., Ko, H. J., et al. (2008). A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 322, 1539–1543.
- Sabio, G., and Davis, R. J. (2010). cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. *Trends Biochem. Sci.* 35, 490–496.
- Sachithanandan, N., Fam, B., Fynch, S., Dzamko, N., Watt, M., Wormald, S., et al. (2010). Liver-specific suppressor of cytokine signaling-3 deletion in mice enhances hepatic insulin sensitivity and lipogenesis resulting in fatty liver and obesity. *Hepatology* 52, 1632–1642.
- Sachithanandan, N., Graham, K., Galic, S., Honeyman, J., Fynch, S., Hewitt, K., et al. (2011). Macrophage deletion of SOCS1 increases sensitivity to LPS and palmitic acid and results in systemic inflammation and hepatic insulin resistance. *Diabetes* 60, 2023–2031.
- Schertzer, J. D., Tamrakar, A. K., Magalhaes, J. G., Pereira, S., Bilan, P. J., Fullerton, M. D., et al. (2011). NOD1 activators link innate immunity to insulin resistance. *Diabetes* 60, 2206–2215.
- Shi, H., Cave, B., Inouye, K., Bjorbaek, C., and Flier, J. S. (2006a). Overexpression of suppressor of cytokine signaling 3 in adipose tissue causes local but not systemic insulin resistance. *Diabetes* 55, 699–707.
- Shi, H., Kokoieva, M., Inouye, K., Tzamelis, I., Yin, H., and Flier, J. (2006b). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 3015–3025.
- Solinas, G., and Karin, M. (2010). JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J.* 24, 2596–2611.
- Solinas, G., Vilcu, C., Neels, J. G., Bandyopadhyay, G. K., Luo, J. L., Naugler, W., et al. (2007). JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab.* 6, 386–397.
- Souza, S. C., Palmer, H. J., Kang, Y. H., Yamamoto, M. T., Muliro, K. V., Paulson, K. E., et al. (2003). TNF-alpha induction of lipolysis is mediated through activation of the extracellular signal related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J. Cell Biochem.* 89, 1077–1086.
- Stienstra, R., Joosten, L. A., Koenen, T., van Tits, B., van Diepen, J. A., van den Berg, S. A., et al. (2010). The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 12, 593–605.
- Stienstra, R., van Diepen, J. A., Tack, C. J., Zaki, M. H., van de Veerdonk, F. L., Perera, D., et al. (2011). Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 15324–15329.
- Suganami, T., Mieda, T., Itoh, M., Shimoda, Y., Kamei, Y., and Ogawa, Y. (2007a). Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 45–49.
- Suganami, T., Tanimoto-Koyama, K., Nishida, J., Itoh, M., Yuan, X., Mizuarai, S., et al. (2007b). Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 84–91.
- Sun, S., Ji, Y., Kersten, S., and Qi, L. (2012). Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annu. Rev. Nutr.* 32, 261–286.
- Symons, A., Beinke, S., and Ley, S. C. (2006). MAP kinase kinases and innate immunity. *Trends Immunol.* 27, 40–48.

- Tamrakar, A. K., Schertzer, J. D., Chiu, T. T., Foley, K. P., Bilan, P. J., Philpott, D. J., et al. (2010). NOD2 activation induces muscle cell-autonomous innate immune responses and insulin resistance. *Endocrinology* 151, 5624–5637.
- Tamura, Y., Ogiwara, T., Uchida, T., Ikeda, F., Kumashiro, N., Nomiyama, T., et al. (2007). Amelioration of glucose tolerance by hepatic inhibition of nuclear factor kappaB in db/db mice. *Diabetologia* 50, 131–141.
- Taniguchi, C. M., Emanuelli, B., and Kahn, C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 85–96.
- Tanti, J. F., Gremaux, T., van Obberghen, E., and Le Marchand-Brustel, Y. (1994). Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 269, 6051–6057.
- Tanti, J. F., and Jager, J. (2009). Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 753–762.
- Toritsu, T., Sato, N., Yoshiga, D., Kobayashi, T., Yoshioka, T., Mori, H., et al. (2007). The dual function of hepatic SOCS3 in insulin resistance *in vivo*. *Genes Cells* 12, 143–154.
- Triantafyllou, M., Gamper, F. G., Haston, R. M., Mouratis, M. A., Morath, S., Hartung, T., et al. (2006). Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J. Biol. Chem.* 281, 31002–31011.
- Tschopp, J., and Schroder, K. (2010). NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 210–215.
- Tsukumo, D., Carvalho-Filho, M., Carvalheira, J., Prada, P. C., Hirabara, S., Schenka, A., et al. (2007). Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1986–1998.
- Tuncman, G., Hirosumi, J., Solinas, G., Chang, L., Karin, M., and Hotamisligil, G. S. (2006). Functional *in vivo* interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 10741–10746.
- Ueki, K., Kadowaki, T., and Kahn, C. R. (2005). Role of suppressors of cytokine signaling SOCS-1 and SOCS-3 in hepatic steatosis and the metabolic syndrome. *Hepatology* 41, 185–192.
- Vallerie, S. N., Furuhashi, M., Fucho, R., and Hotamisligil, G. S. (2008). A predominant role for parenchymal c-Jun amino terminal kinase (JNK) in the regulation of systemic insulin sensitivity. *PLoS ONE* 3:e3151. doi: 10.1371/journal.pone.0003151
- Vandanmagsar, B., Youm, Y. H., Ravussin, A., Galgani, J. E., Stadler, K., Mynatt, R. L., et al. (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* 17, 179–188.
- van Diepen, J. A., Wong, M. C., Guigas, B., Bos, J., Stienstra, R., Hodson, L., et al. (2011). Hepatocyte-specific IKK-beta activation enhances VLDL-triglyceride production in APOE*3-Leiden mice. *J. Lipid Res.* 52, 942–950.
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J., Carvalho, F., Cullender, T., Mwangi, S., Srinivasan, S., et al. (2010). Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 328, 228–231.
- Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M. T., et al. (2011). Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat. Immunol.* 12, 408–415.
- Wood, I. S., de Heredia, F. P., Wang, B., and Trayhurn, P. (2009). Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc. Nutr. Soc.* 68, 370–377.
- Wunderlich, F. T., Luedde, T., Singer, S., Schmidt-Supprian, M., Baumgartl, J., Schirmacher, P., et al. (2008). Hepatic NF-kappa B essential modulator deficiency prevents obesity-induced insulin resistance but synergizes with high-fat feeding in tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1297–1302.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., and Reed, J. C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* 115, 2656–2664.
- Yang, R., and Trevillyan, J. M. (2008). c-Jun N-terminal kinase pathways in diabetes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2702–2706.
- Ye, D., Li, F., Lam, K., Li, H., Jia, W., Wang, Y., et al. (2012). Toll-like receptor-4 mediates obesity-induced non-alcoholic steatohepatitis through activation of X-box binding protein-1 in mice. *Gut* 61, 1058–1067.
- Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z. W., Karin, M., et al. (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293, 1673–1677.
- Zabolotny, J. M., Kim, Y. B., Welsh, L. A., Kershaw, E. E., Neel, B. G., and Kahn, B. B. (2008). Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 283, 14230–14241.
- Zadjali, F., Santana-Ferre, R., Vesterlund, M., Carow, B., Mirecki-Garrido, M., Hernandez-Hernandez, I., et al. (2012). SOCS2 deletion protects against hepatic steatosis but worsens insulin resistance in high-fat-diet-fed mice. *FASEB J.* 26, 3282–3291.
- Zhang, X., Xu, A., Chung, S. K., Cresser, J. H., Sweeney, G., Wong, R. L., et al. (2011). Selective inactivation of c-Jun NH2-terminal kinase in adipose tissue protects against diet-induced obesity and improves insulin sensitivity in both liver and skeletal muscle in mice. *Diabetes* 60, 486–495.
- Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., and Cai, D. (2008). Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135, 61–73.
- Zhao, L., Hu, P., Zhou, Y., Purohit, J., and Hwang, D. (2011). NOD1 activation induces proinflammatory gene expression and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E587–E598.
- Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., and Tschopp, J. (2010). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammatory activation. *Nat. Immunol.* 11, 136–140.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 29 November 2012; accepted: 19 December 2012; published online: 08 January 2013.

Citation: Tanti J-F, Ceppo F, Jager J and Berthou F (2013) Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front. Endocrin.* 3:181. doi: 10.3389/fendo.2012.00181

This article was submitted to *Frontiers in Diabetes, a specialty of Frontiers in Endocrinology*.

Copyright © 2013 Tanti, Ceppo, Jager and Berthou. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

Implication des MAP kinases dans l'inflammation et l'insulino-résistance associées à l'obésité

Franck Ceppo¹, Jennifer Jager^{1,2}, Flavien Berthou¹, Sophie Giorgetti-Peraldi¹, Mireille Cormont¹, Frédéric Bost¹ et Jean-François Tanti¹

¹ INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Route de Saint-Antoine de Ginestière, 06204 Nice Cedex 3, France

² Adresse actuelle : Division of Endocrinology, Diabetes, and Metabolism, Department of Medicine, Department of Genetics, and The Institute for Diabetes, Obesity, and Metabolism, Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania, PA 19104, Philadelphia, USA

Auteur correspondant : Jean-François Tanti, tanti@unice.fr

Reçu le 3 mars 2014

Résumé – La résistance à l'action de l'insuline ou insulino-résistance est souvent associée à l'obésité et c'est un facteur de risque important pour le développement du diabète de type 2, de maladies cardiovasculaires et hépatiques ; elle pourrait également favoriser l'apparition et/ou l'agressivité de certains cancers. L'insulino-résistance est due à des altérations de la signalisation de l'insuline dans ses tissus cibles. Au cours de ces dernières années, l'inflammation chronique de bas grade associée à l'obésité est apparue comme acteur important dans le développement de l'insulino-résistance. En effet, les cytokines inflammatoires activent différentes voies de signalisation qui interfèrent avec la signalisation insulinique. Parmi les différentes voies de signalisation activées par les cytokines inflammatoires, cette revue détaillera plus particulièrement l'implication des voies de signalisation des MAP (*Mitogen Activated Protein kinases*) JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) et ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases*) dans le développement des altérations de la signalisation insulinique et discutera la possibilité de cibler ces protéines pour réduire l'insulino-résistance.

Mots clés : Cytokines / MAP kinases / inflammation / insulino-résistance / signalisation de l'insuline

Abstract – Implication of MAP kinases in obesity-induced inflammation and insulin resistance.

Insulin resistance is often associated with obesity and is a major risk factor for development of type 2 diabetes as well as cardiovascular and hepatic diseases. Insulin resistance may also increase the incidence or the aggressiveness of some cancers. Insulin resistance occurs owing to defects in insulin signaling in target tissues of this hormone. During the last ten years, it became evident that the chronic low-grade inflammatory state that develops during obesity plays an important role in insulin resistance development. Indeed, inflammatory cytokines activate several signaling pathways that impinge on the insulin signaling pathway. Among them, this review will focus on the implication of the MAP kinases JNK and ERK1/2 signaling in the development of insulin signaling alterations and will discuss the possibility to target these pathways in order to fight insulin resistance.

Key words: Cytokines / MAP kinases / inflammation / insulin resistance / insulin signaling

Abréviations

Akt (PKB)	<i>Thymoma viral proto-oncogene (Protein Kinase B)</i>
AS 160	<i>AKT substrate de 160 kD</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
IKK	<i>I Kappa B Kinase</i>
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
JNK	<i>c-Jun amino-terminal Kinase</i>
KRLB	<i>Kinase Regulatory Loop Binding</i>
LPS	<i>LipoPolySaccharides</i>
MAP2K ou MEK	<i>MAP kinase-kinase</i>
MAP3K	<i>MAP kinase-kinase-kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
PDK-1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PH	<i>Pleckstrin Homology</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol 4.5 phosphate</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol 3.4.5 phosphate</i>
PTB	<i>PhosphoTyrosine Binding</i>
SH2	<i>Src Homology domain 2</i>
SOCS	<i>Suppressor Of Cytokine Signalling</i>
Sos	<i>Son of Sevenless</i>
Tpl2	<i>Tumor progression locus 2</i>

Introduction

L'augmentation constante du nombre de personnes en surpoids ou obèses à travers le monde constitue un problème majeur de santé. Le surpoids et l'obésité favorisent l'apparition de nombreuses pathologies accroissant la mortalité et la morbidité. Une des complications métaboliques majeures de l'obésité est la résistance à l'insuline ou insulino-résistance qui se définit par une diminution de la capacité des tissus cibles à répondre physiologiquement à l'insuline, et notamment les muscles squelettiques, le tissu adipeux, le foie et le cerveau. L'insulino-résistance se caractérise principalement par une diminution de la captation de glucose par les muscles squelettiques et le tissu adipeux, par une augmentation de la production hépatique de glucose, par une diminution de l'action anti-lipolytique de l'insuline dans le tissu adipeux et par des perturbations de la lipogenèse dans le foie et le tissu adipeux (Biddinger & Kahn, 2006). Les perturbations du métabolisme gluco-lipidique générées par l'insulino-résistance augmentent le risque de développement du

diabète de type 2, de maladies cardiovasculaires et hépatiques. L'insulino-résistance pourrait également favoriser l'apparition et/ou l'agressivité de certains cancers (Gallagher & LeRoith, 2010; Rask-Madsen & Kahn, 2012). La compréhension des mécanismes susceptibles d'entraîner cet état de résistance à l'insuline est donc un enjeu essentiel.

Une inflammation chronique de bas grade a été mise en évidence chez les patients obèses, qui est caractérisée par une élévation des niveaux plasmatiques de nombreux médiateurs de l'inflammation. À l'inverse, la perte de poids est associée à une diminution et une normalisation des niveaux plasmatiques de ces médiateurs inflammatoires (Forsythe *et al.*, 2008). Cette inflammation de bas grade touche différents tissus impliqués dans le contrôle de l'homéostasie métabolique tels que le foie, le tissu adipeux, le pancréas endocrine, l'hypothalamus, l'intestin et à un degré moindre les muscles. Elle a été nommée « inflammation métabolique » ou « méta-inflammation » et il apparaît de plus en plus évident que cette méta-inflammation est impliquée dans le développement de l'insulino-résistance (Gregor & Hotamisligil, 2011; Dali-Youcef *et al.*, 2013). Les causes de cette inflammation ne sont pas encore complètement élucidées mais plusieurs acteurs pourraient agir de concert. Les modifications quantitatives et qualitatives de nutriments chez l'obèse sont sans aucun doute un facteur important dans son déclenchement. Ainsi, un excès d'acides gras, en particulier d'acides gras saturés mais également de sucres, va déclencher ces processus inflammatoires probablement *via* l'activation de systèmes de reconnaissance de signaux de danger (Gregor & Hotamisligil, 2011). Des modifications du microbiote intestinal en réponse à ces changements de nutriments entraînent une augmentation modérée des taux circulants de lipopolysaccharides (LPS) ou de peptidoglycans bactériens, créant ainsi une endotoxémie métabolique qui participe également au développement de cette inflammation (Burcelin, 2012; Nicholson *et al.*, 2012). L'hypoxie qui se développe dans le tissu adipeux d'obèse pourrait également contribuer à l'inflammation de ce tissu (Wood *et al.*, 2009) mais également perturber la signalisation insulinique adipocytaire, comme le montre nos travaux (Regazzetti *et al.*, 2009).

Cette inflammation chronique implique à la fois les cellules métaboliques comme les adipocytes ou les hépatocytes mais également les cellules immunitaires qui infiltrent les différents tissus. L'obésité s'accompagne en effet d'un remodelage de la population de cellules immunitaires dans différents tissus. Les modifications des populations de cellules immunitaires ont été particulièrement bien caractérisées dans le tissu adipeux. Les études sur différents modèles de souris obèses ont démontré que l'obésité

s'accompagne dans le tissu adipeux d'une augmentation d'un développement des cellules de l'immunité innée ou adaptative ayant un profil pro-inflammatoire (Lolmède *et al.*, 2011; Bertola *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012). Chez l'homme obèse, on observe également une augmentation du nombre des macrophages et de lymphocytes T qui contribue à l'inflammation du tissu adipeux (Lolmède *et al.*, 2011). Ces cellules immunitaires activées produisent différentes cytokines et chemokines qui, de manière paracrine ou endocrine, vont perturber la signalisation et les effets métaboliques de l'insuline. Les cytokines et les LPS, en se liant sur leur récepteur présent sur les adipocytes, les hépatocytes ou les cellules musculaires, activent différentes voies de signalisation incluant la voie IKK/NF κ B, les SOCS (*Suppressor of Cytokine Signalling*) et la voie des MAP (*Mitogen-Activated Protein*) kinases (ERK1/2, JNK, p38) qui vont interférer avec la signalisation de l'insuline.

Dans cette revue, après une brève description de la signalisation de l'insuline, nous détaillerons plus particulièrement l'implication des MAP kinases JNK (*c-Jun amino-terminal Kinase*) et ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) dans le développement de l'insulino-résistance et discuterons de la possibilité de cibler ces protéines pour la réduire. L'implication des SOCS et de la voie IKK/NF κ B dans l'insulino-résistance ne sera pas abordée mais le lecteur pourra se référer à des revues récentes (Shoelson *et al.*, 2003; Lebrun & Van Obberghen, 2008; Donath & Shoelson, 2011; Tanti *et al.*, 2013).

Les effets métaboliques et la signalisation de l'insuline

L'insuline, sécrétée par les cellules β -pancréatiques en réponse à une élévation de la glycémie, est une hormone anabolique qui favorise le transport du glucose dans les muscles et les adipocytes ainsi que la synthèse de glycogène dans le foie et les muscles et qui inhibe la production hépatique de glucose. L'insuline participe également à la régulation du métabolisme des lipides en facilitant le transport des acides gras alimentaires et leur stockage sous forme de triglycérides dans les adipocytes, en stimulant la lipogenèse *de novo* dans le tissu adipeux et le foie, en inhibant la lipolyse adipocytaire et la synthèse hépatique des VLDL. L'insuline joue également un rôle important dans la synthèse protéique, en particulier musculaire.

Les effets de l'insuline sont transmis par un récepteur hétérotétramérique composé de deux sous-unités α extracellulaires et deux sous-unités β transmembranaires associées par des ponts disulfures. La liaison de l'insuline aux sous-unités α entraîne un changement de leur conformation qui permet

l'augmentation de l'activité tyrosine kinase des sous-unités β (Taniguchi *et al.*, 2006). Les sous-unités β s'autophosphorylent sur des résidus tyrosine (Tyr1146, Tyr1150 et Tyr1151) situés dans le domaine kinase, modulant ainsi le niveau d'activité tyrosine kinase du récepteur. La phosphorylation du résidu Tyr960 contenu dans le motif NPXY de la région juxtamembranaire est essentielle pour la liaison de différents substrats du récepteur de l'insuline (Taniguchi *et al.*, 2006).

Le récepteur de l'insuline activé va initier une cascade de signalisation complexe. Il phosphoryle différents substrats qui déclenchent à leur tour l'activation de deux voies principales. La voie des protéines Ras et MAPK ERK est impliquée dans le contrôle de l'expression génique, dans la croissance et la différenciation de nombreux types cellulaires dont les adipocytes. Cette voie de signalisation est activée par la liaison de la protéine adaptatrice Shc aux récepteurs de l'insuline. Cette protéine est alors phosphorylée sur tyrosine par le récepteur. Elle interagit avec les domaines SH2 (*Src Homology domain 2*) de la protéine Grb2. Cette dernière active Sos (*Son of Sevenless*) un facteur d'échange GDP/GTP pour Ras, permettant ainsi l'activation de Ras et de la cascade de signalisation aboutissant à l'activation des MAPK ERK.

La voie des protéines phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et Akt (également appelée PKB) est impliquée dans la transmission des effets métaboliques de l'insuline (figure 1) et interagit avec la voie Ras/MAPK pour contrôler la croissance et la différenciation. Les protéines de la famille IRS (*Insulin Receptor Substrate*) sont les substrats du récepteur de l'insuline qui transmettent les différents effets métaboliques de l'insuline par activation de la voie PI3K-Akt (Taniguchi *et al.*, 2006). Parmi les différentes isoformes des IRS, les protéines IRS-1 et IRS-2 jouent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie du glucose par l'insuline et leurs fonctions sont altérées dans les situations d'insulino-résistance (White, 2002; Taniguchi *et al.*, 2006). Les protéines IRS-1 et IRS-2 possèdent dans la partie N-terminale un domaine PH (*Pleckstrin Homology domain*), qui reconnaît les phospholipides membranaires. Ce domaine servirait notamment à ancrer les protéines IRS à la membrane plasmique, à proximité des récepteurs de l'insuline. Ce domaine PH est suivi d'un domaine PTB (*Phosphotyrosine Binding Domain*), qui reconnaît les résidus tyrosine phosphorylés du récepteur de l'insuline et plus particulièrement le motif NPXpY960 du domaine juxtamembranaire. Les domaines PH et PTB permettent ainsi une interaction spécifique des IRS avec le récepteur de l'insuline et sont nécessaires pour leur phosphorylation efficace par le récepteur de l'insuline. La protéine IRS-2 possède de plus un domaine KRLB (*Kinase Regulatory Loop Binding*) qui interagit

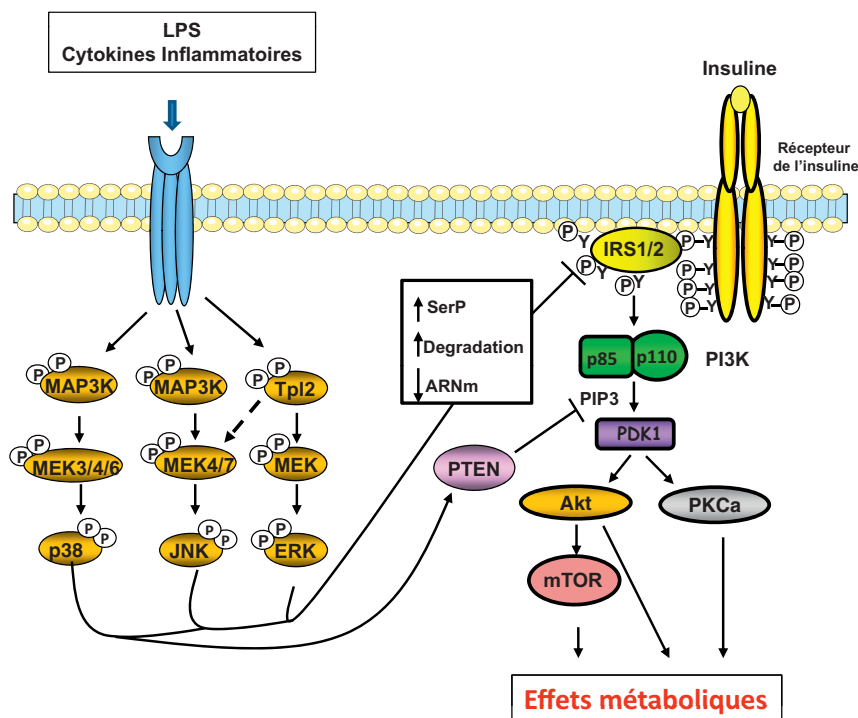


Fig. 1. L'activation des MAP kinases ERK1/2, JNK et p38 par les médiateurs inflammatoires altère la signalisation de l'insuline. L'activation de l'axe de signalisation IRS/PI3K/Akt par l'insuline est impliquée dans les effets métaboliques de l'hormone. L'activation des MAP kinases ERK1/2, JNK, p38 par les cytokines inflammatoires ou LPS inhibe l'expression et/ou la tyrosine phosphorylation des IRS par différents mécanismes (augmentation de la sérine phosphorylation, dégradation, inhibition de la transcription de l'ARNm). L'augmentation par p38 de l'activité de la lipide phosphatase PTEN qui déphosphoryle les PIP3 inhibe également l'activation d'Akt en réponse à l'insuline.

avec la boucle du domaine catalytique du récepteur de l'insuline. Dans la partie C-terminale, les protéines IRS contiennent de nombreux sites potentiels de phosphorylation sur tyrosine, sérine et thréonine. Les résidus tyrosine phosphorylés sont des motifs d'ancrage pour différentes protéines à domaines SH2 dont la PI3K. La liaison de la PI3K à IRS-1/-2 augmente son activité lipide kinase, entraînant la phosphorylation des phosphatidylinositol 4.5 phosphates (PIP2) en position 3 du cycle inositol. Les phosphatidylinositol 3.4.5 phosphates (PIP3) ainsi générés sont des seconds messagers intracellulaires qui activent Akt et les protéines kinases C atypiques ζ et λ via l'activation de la protéine PDK-1 (figure 1 et Taniguchi *et al.*, 2006).

L'axe PI3K/Akt joue donc un rôle majeur dans les effets métaboliques de l'insuline, dont la stimulation du transport de glucose. Ainsi, la protéine kinase Akt active intervient dans la stimulation du transport de glucose par l'intermédiaire probable de la protéine AS 160 (*AKT substrate* de 160 kD). La stimulation du transport de glucose par l'insuline résulte d'une translocation de vésicules contenant le transporteur de glucose Glut4 d'un compartiment intracellulaire à la membrane plasmique. Ce mécanisme de translocation

est très complexe et fait lui-même intervenir de nombreux intermédiaires protéiques. Parmi ceux-ci, notre groupe a démontré l'importance des petites GTPases Rab4a et Rab4b dans le trafic intracellulaire de Glut4 (Mari *et al.*, 2006 ; Kaddai *et al.*, 2008, 2009). Les étapes et les mécanismes de régulation de ce trafic ne seront pas décrits dans cette revue mais les protéines qui contrôlent ce trafic pourraient être des cibles thérapeutiques potentielles. Les lecteurs intéressés peuvent se référer à d'excellentes revues dans ce domaine (Kaddai *et al.*, 2008 ; Morgan *et al.*, 2011 ; Leto & Saltiel, 2012).

Dans les situations d'insulino-résistance, les effets métaboliques de l'insuline sont diminués. Ceci est dû à une altération de la signalisation de l'insuline à différents niveaux mais en particulier au niveau de l'axe IRS/PI3K/Akt. Les cytokines inflammatoires produites en excès dans les tissus obèses contribuent aux altérations de cet axe de signalisation en activant différentes voies de signalisation (Tanti & Jager, 2009 ; Tanti *et al.*, 2013). Dans la suite de cette revue nous discuterons plus particulièrement du rôle des MAP kinases dans les altérations de la signalisation insulinaire et le développement de l'insulino-résistance.

MAP kinase et insulino-résistance

Cinq groupes de *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAP kinases) ont été caractérisés dans les cellules de mammifères : les *Extracellular signal-Regulated Kinases 1 et 2* (ERK1 et ERK2 ou p44 et p42) ; les *c-Jun amino-terminal Kinases 1, 2 et 3* (JNK1, JNK2 et JNK3) appelées également *Stress-Activated Protein Kinases 1, 2 et 3* (SAPK1, SAPK2 et SAPK3) ; les p38MAPK α , β , γ , et δ ; ERK5 ; et les MAP kinases orphelines ERK 3, 4, 6, 7 et 8 (Keshet & Seger, 2010). Les MAP kinases sont activées par différents stimuli, dont des facteurs de croissance, mais également par des stimuli de stress, dont les cytokines inflammatoires. Elles sont impliquées dans différents processus cellulaires tels que le métabolisme, la régulation génique, la prolifération, la différenciation, la motilité, la survie et la mort cellulaire (Keshet & Seger, 2010). Par conséquent, il n'est pas étonnant de retrouver des dérégulations de l'activité des MAP kinases dans différentes pathologies et en particulier dans l'insulino-résistance et le diabète de type 2. L'activité des MAP kinases ERK1/2, JNK, p38 est en effet augmentée dans différents tissus insulino-résistants.

Nous décrirons ensuite certains des mécanismes moléculaires par lesquels les MAP kinases ERK1/2, JNK et p38 altèrent la signalisation insulinique (figure 1) et présenterons les études chez l'animal démontrant le rôle des MAP kinases ERK1 et JNK1 dans le développement de l'insulino-résistance.

Implication des MAP kinases dans les altérations de la signalisation de l'insuline

Un des mécanismes importants reliant activation anormale des MAP kinases et altération de la signalisation insulinique est la phosphorylation d'IRS1 et/ou d'IRS2 sur des résidus de sérine (figure 1). Comme décrit précédemment, le récepteur de l'insuline activé phosphoryle les IRS sur des résidus de tyrosine permettant ainsi l'activation de la cascade de signalisation insulinique. Par contre, la phosphorylation des IRS sur sérine est un mécanisme de régulation négative de la voie de signalisation insulinique. Ce mécanisme est activé par l'insuline pour contrôler son propre signal. Notre groupe a contribué à montrer que ce mécanisme est également utilisé de manière incontrôlée par différents agents impliqués dans l'insulino-résistance tels que les cytokines inflammatoires conduisant à une altération de la signalisation insulinique (Tanti *et al.*, 1994 ; Hotamisligil *et al.*, 1996 ; Gual *et al.*, 2005 ; Boura-Halfon & Zick, 2009 ; Tanti & Jager, 2009). Des anomalies de la phosphorylation sur des résidus sérine d'IRS1 sont observées dans les muscles, le foie et le tissu adipeux de souris ou de patients obèses (Zick, 2003 ;

Gual *et al.*, 2005 ; Bouzakri *et al.*, 2006 ; Tanti & Jager, 2009). Les MAP kinases JNK et les ERK sont principalement impliquées dans la phosphorylation d'IRS-1 et d'IRS-2 (figure 1). Les JNK phosphorylent différents résidus de sérine localisés principalement à proximité du domaine PTB, ce qui entraînerait un changement de la conformation de ce domaine, inhibant ainsi l'interaction d'IRS-1 avec le récepteur de l'insuline. La résultante est une diminution de la tyrosine phosphorylation d'IRS-1 par le récepteur de l'insuline et/ou sa dégradation par le protéasome. Les ERK phosphorylent préférentiellement des sérines situées dans l'extrémité C-terminale d'IRS-1, à proximité de résidus tyrosine participant à l'interaction d'IRS-1 avec la PI3K. La phosphorylation de ces sites réduirait l'interaction de la PI3K avec IRS-1, contribuant ainsi à diminuer les effets métaboliques de l'insuline (Gual *et al.*, 2005 ; Boura-Halfon & Zick, 2009 ; Tanti & Jager, 2009). La p38MAPK participe mais de manière indirecte à l'augmentation de la phosphorylation d'IRS-1 sur des résidus sérine *via* l'activation d'IKK β , une autre kinase importante dans la signalisation des cytokines inflammatoires (figure 1).

Les MAP kinases contrôlent également négativement l'expression des IRS en diminuant l'expression de son ARNm (figure 1). Ainsi, l'activité constitutive des kinases ERK et p38 entraîne une diminution de l'expression transcriptionnelle et protéique d'IRS-1 et d'IRS-2 (Fujishiro *et al.*, 2003). Nous avons montré que l'IL-1 β , *via* l'activation des kinases ERK, est capable d'altérer la réponse insulinique des adipocytes en diminuant l'expression de l'ARNm et de la protéine IRS-1 (Jager *et al.*, 2007).

L'activation de la p38 MAP kinase entraîne également une augmentation de la lipide phosphatase PTEN, diminuant ainsi les niveaux de PIP3 et conduisant à une inhibition de l'axe de signalisation PI3K/Akt.

En plus d'interférer avec la signalisation insulinique, l'activation des MAP kinases ERK, JNK et p38 par les cytokines inflammatoires ou par une exposition prolongée à l'insuline contrôle négativement l'expression du transporteur de glucose Glut4 dans les adipocytes ou les muscles (Fujishiro *et al.*, 2001 ; Carlson & Rondinone, 2005).

Conséquences de l'invalidation de JNK1 sur le développement de l'insulino-résistance

Parmi les différentes isoformes de JNK, les études d'invalidation génique chez l'animal ont mis en évidence le rôle de la kinase JNK1 dans l'insulino-résistance. L'étude princeps des groupes de Karin et Hotamisligil a montré que les souris *Jnk1*^{-/-} ont un poids et une masse adipeuse totale inférieurs à ceux des souris sauvages, que ce soit sous régime riche en graisses ou

régime normal. Ce phénotype pourrait s'expliquer par une légère augmentation de la dépense énergétique. La sensibilité à l'insuline des souris *Jnk1*^{-/-} soumises à un régime hyperlipidique est améliorée, ce qui pourrait être expliqué par une diminution de la sérine phosphorylation d'IRS-1. L'inflammation induite par un régime riche en graisses est également diminuée chez les souris *Jnk1*^{-/-} (Hirosumi *et al.*, 2002). À partir de cette étude, plusieurs modèles de souris portant une invalidation de *Jnk1* ciblée dans différents tissus ont été générés. Ainsi, il a été mis en évidence que l'activité de JNK1 dans les cellules myéloïdes joue un rôle important dans l'inflammation induite par un régime riche en graisses et dans l'insulino-résistance (Solinas *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2013) mais une autre étude ne confirme pas tout à fait ces résultats (Vallerie *et al.*, 2008). De même, l'invalidation de JNK1 dans le tissu adipeux réduit son inflammation et améliore la sensibilité à l'insuline du foie. Par contre, les résultats sont contradictoires sur la correction de l'insulino-résistance systémique (Sabio & Davis, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Cette amélioration de la sensibilité à l'insuline du foie est consécutive à une diminution de production d'IL-6 par le tissu adipeux. Ainsi, l'activation soutenue de JNK1 dans le tissu adipeux pourrait entraîner des anomalies dans la production de certaines adipocytokines conduisant au développement d'une insulino-résistance hépatique. L'invalidation de JNK1 spécifiquement dans les muscles réduit l'insulino-résistance musculaire probablement *via* une diminution de la sérine phosphorylation des IRS mais n'a que peu d'effet bénéfique sur l'insulino-résistance systémique (Sabio & Davis, 2010). La surexpression musculaire d'une forme constitutivement active de JNK altère la signalisation insulinique au niveau d'IRS-1 et Akt et réduit la captation de glucose musculaire (Henstridge *et al.*, 2012). Une suractivation de la voie JNK1 au niveau hypothalamique et pituitaire pourrait également contribuer à la prise de poids en dérégulant le contrôle de l'homéostasie métabolique et endocrine. En effet, l'invalidation de JNK1 au niveau du système nerveux central, ou restreint à la glande pituitaire antérieure, est suffisante pour supprimer l'obésité induite par un régime riche en graisses. Cette résistance à la prise de poids est due en partie à une augmentation de la dépense énergétique *via* l'activation de l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde et plus précisément par une augmentation de la TSH hypophysaire causée par une réduction d'expression de l'iodothyronine déiodinase de type 2 (Sabio & Davis, 2010; Vernia *et al.*, 2013). Il est important de noter que JNK1 ne joue pas toujours un rôle négatif dans le contrôle de l'homéostasie métabolique. En effet, JNK1 semble avoir un rôle protecteur dans le foie contre le développement de la stéatose hépatique et de l'insulino-résistance (Sabio & Davis, 2010). Ceci est

à prendre en compte dans le cadre de stratégies thérapeutiques visant à cibler les JNK mais globalement l'ensemble des études chez l'animal suggère que les JNK pourraient être des cibles pharmacologiques intéressantes pour le traitement de l'insulino-résistance et du diabète de type 2. Des inhibiteurs pharmacologiques dirigés contre les JNK ont d'ailleurs été testés dans ce but chez l'animal. Des inhibiteurs compétitifs de l'ATP montrent des effets protecteurs contre la résistance à l'insuline et une amélioration de l'insulinosécrétion chez la souris obèse (Yang & Trevillyan, 2008). Néanmoins, étant donné des problèmes de spécificité, des études complémentaires sont nécessaires pour conclure avec certitude que les effets observés sont bien dus à l'inhibition de la voie des JNK. Des inhibiteurs de JNK qui ne sont pas en compétition avec l'ATP ont été également développés, à partir de l'observation selon laquelle des peptides inhibant l'interaction des JNK avec les protéines d'échafaudage JIP-1 pouvaient bloquer de manière extrêmement sélective l'activation de JNK. Un de ces inhibiteurs prévient les effets délétères du TNF- α dans le foie et améliore la sensibilité à l'insuline de souris obèses (Yang & Trevillyan, 2008). Ces résultats suggèrent que les inhibiteurs de la voie de signalisation des MAP kinases JNK pourraient être de nouveaux agents thérapeutiques pour lutter contre l'insulino-résistance et le diabète de type 2. Néanmoins, l'implication de la voie JNK dans de nombreux processus physiologiques serait peut-être un obstacle à l'utilisation de ces inhibiteurs. Ainsi, les stratégies visant à inhiber plus spécifiquement l'une des isoformes de JNK ou certains signalosomes des JNK pourraient constituer une stratégie de choix dans le futur.

Conséquences de l'invalidation d'ERK1 sur le développement de l'insulino-résistance

Notre équipe a montré que les souris *Erk1*^{-/-} sont résistantes au développement de l'obésité induite par un régime hyperlipidique du fait d'une diminution de l'adipogenèse et d'une augmentation de la dépense énergétique et sont protégées du développement de l'insulino-résistance (Bost *et al.*, 2005). À l'inverse, les souris génétiquement invalidées pour la protéine p62, un inhibiteur de la voie de signalisation des MAP kinases ERK, développent au bout de quelques mois une obésité sévère et une résistance à l'insuline. Ce phénotype est perdu si ces souris sont croisées avec des souris *Erk1*^{-/-}, démontrant ainsi le rôle de ERK1 dans ce phénotype (Lee *et al.*, 2010). Avant l'apparition de l'obésité, les souris *p62*^{-/-} ne présentent pas de modifications de la sensibilité à l'insuline. Ces résultats suggèrent que l'insulino-résistance développée par les souris *p62*^{-/-} n'est pas

directement liée à l'invalidation de p62, mais serait la conséquence du développement de l'obésité due à une augmentation de l'adipogenèse (Rodriguez *et al.*, 2006).

Ces deux études ont mis en évidence l'implication des kinases ERK dans le développement de l'obésité. Cependant elles ne permettaient pas de conclure sur le rôle de la voie ERK dans l'insulino-résistance *per se*. En effet, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline pouvait résulter de la prévention de l'obésité. Toutefois, une implication directe des kinases ERK dans le développement de la résistance à l'insuline, indépendamment de l'obésité, est suggérée par deux autres études. Ainsi, la surexpression hépatique de MKP-4, une phosphatase impliquée dans l'inhibition des kinases ERK et JNK, entraîne chez la souris obèse une diminution de la phosphorylation de ERK et JNK, et une amélioration de la signalisation de l'insuline et de la tolérance au glucose sans modification du poids des souris (Emanuelli *et al.*, 2008). Cependant, étant donné que MKP-4 inhibe à la fois ERK et JNK, cette étude ne permettait pas de conclure définitivement quant à un rôle de la voie ERK dans l'insulino-résistance *in vivo*. Une preuve plus directe de l'implication des kinases ERK dans le développement de l'insulino-résistance indépendamment de l'obésité vient de nos travaux sur l'invalidation de la MAP kinase ERK1 chez des souris génétiquement obèses *ob/ob* qui sont déficientes en leptine, une hormone anorexigène. Les souris *ob/ob* sont hyperphagiques, développent une obésité massive et sont fortement insulino-résistantes, certaines d'entre elles développant un diabète. Nous avons mis en évidence (Jager *et al.*, 2011) que l'invalidation d'Erk1 chez ces souris ne modifie pas leur prise de poids. Par contre, malgré cette obésité massive, elles présentent une meilleure sensibilité à l'insuline, une diminution de la stéatose hépatique, une amélioration de la signalisation et des effets métaboliques de l'insuline dans les muscles et le tissu adipeux associée à une diminution de l'inflammation du tissu adipeux (figure 2).

Implication de la MAP3 kinase Tpl2 dans l'insulino-résistance et l'inflammation associée à l'obésité

Ces études chez l'animal suggèrent fortement que l'inhibition des ERK pourrait conduire à une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Cependant, le ciblage direct de ces protéines pourrait avoir des effets indésirables importants car elles sont impliquées dans de nombreux processus biologiques. Une alternative possible serait de cibler des protéines qui contrôlent l'activation des ERK spécifiquement en réponse aux stress, en particulier inflammatoires, qui se développent lors de l'obésité.

L'activation des ERK, ainsi que celle des autres membres de la famille des MAP kinases, nécessite une cascade de phosphorylations qui débute par l'activation d'une MAP kinase-kinase-kinase (MAP3K). Une fois activées, les MAP3K phosphorylent les MAP kinases-kinases (MAP2K ou MEK) sur des résidus sérine et/ou thréonine situés dans leur boucle d'activation, permettant ainsi leur activation. Les MAP2K vont ensuite activer les MAP kinases par double phosphorylation sur des résidus thréonine et tyrosine situés dans leur boucle d'activation (figure 1). Parmi toutes les MAP3K régulant l'activation des ERK, la MAP3K8 appelée Tpl2 (*Tumor progression locus 2*) ou Cot (*Cancer Osaka Thyroid*) est activée plus particulièrement par les stimuli inflammatoires (figure 1) (Gantke *et al.*, 2011, 2012). Tpl2 est très exprimée dans les cellules hématopoïétiques et participe au contrôle de la réponse inflammatoire. Elle est impliquée dans l'activation des cellules T et des macrophages et dans ces derniers, elle est essentielle pour la maturation du pro-TNF α en TNF α (Dumitru *et al.*, 2000; Gantke *et al.*, 2011, 2012). Nous avons montré une augmentation d'expression de Tpl2 dans le tissu adipeux de souris et de patients obèses/diabétiques et également que les cytokines inflammatoires augmentaient l'expression de Tpl2 dans les adipocytes *via* la voie IKK β /NF κ B (figure 3). Dans les adipocytes, Tpl2 contrôle l'activation de la voie ERK1/2 spécifiquement en réponse aux cytokines inflammatoires. Son inhibition entraîne une diminution de la sérine phosphorylation d'IRS-1 et une inhibition de la lipolyse induites par les cytokines (Jager *et al.*, 2010). Récemment, nous avons montré (Ceppo *et al.*, 2014) que Tpl2 participait au « dialogue » entre adipocytes et macrophages, conduisant à la production de cytokines inflammatoires par les macrophages et à l'insulino-résistance adipocytaire induite par les macrophages ou par le LPS (figure 3). Le ciblage pharmacologique de Tpl2 pourrait donc être bénéfique à double titre : d'une part en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation dans les cellules immunitaires et d'autre part en inhibant leurs effets délétères au sein des cellules cibles de l'insuline, dont les adipocytes. Ce concept reste cependant à valider puisque les études chez l'animal sont pour l'instant contradictoires. En effet, l'équipe du Dr. Greenberg a montré que l'invalidation globale de Tpl2 prévient l'insulino-résistance chez la souris obèse et diminue l'inflammation du tissu adipeux (Perfield *et al.*, 2011) mais cette observation a été contredite par une autre étude (Lancaster *et al.*, 2012).

Conclusion

Dans différents tissus, au cours de l'obésité, les cytokines inflammatoires activent un réseau de

Souris *ob/ob-Erk1^{-/-}* vs Souris *ob/ob*

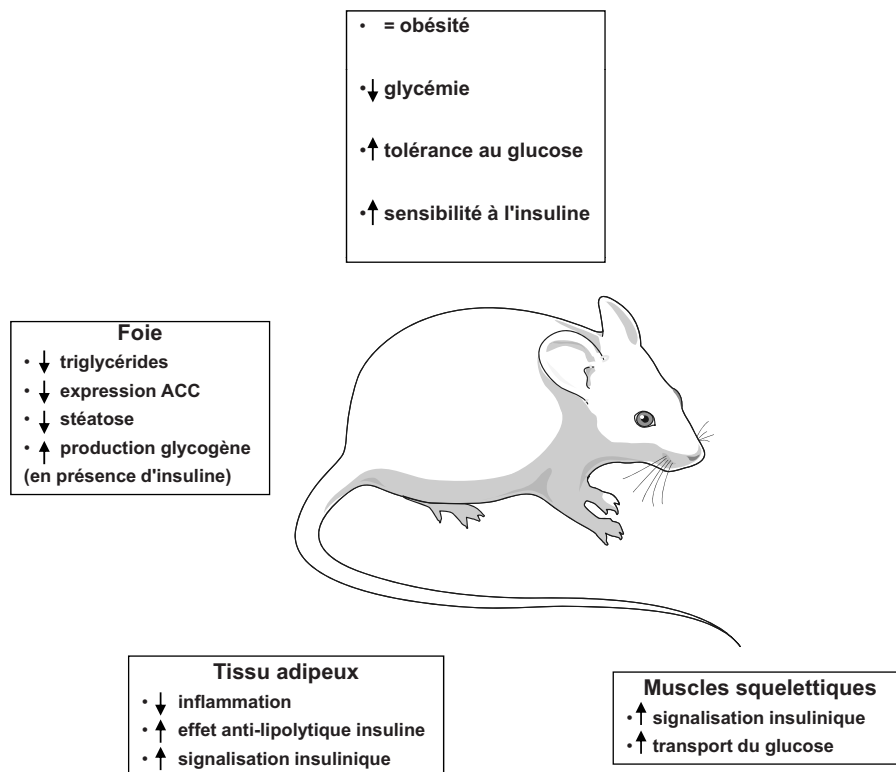


Fig. 2. Phénotype métabolique des souris *ob/ob* invalidées pour Erk1. L'invalidation de la kinase ERK1 chez la souris obèse insulino-résistante *ob/ob* ne corrige pas son obésité. Cependant, malgré cette obésité, les souris *ob/ob-Erk1^{-/-}* présentent une amélioration de leur tolérance au glucose et de leur sensibilité à l'insuline. La signalisation et les effets de l'insuline dans les muscles (transport de glucose) et dans le tissu adipeux (anti-lipolyse) sont améliorés. La stéatose hépatique est diminuée ainsi que l'inflammation du tissu adipeux.

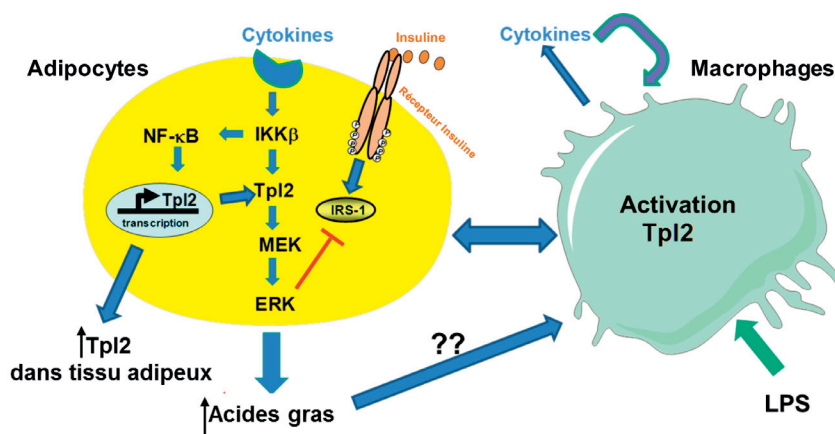


Fig. 3. La MAP3 kinase Tpl2 est un nouvel acteur potentiel de l'inflammation et de l'insulino-résistance associées à l'obésité. L'expression de Tpl2 est augmentée dans le tissu adipeux obèse et est contrôlée par les cytokines inflammatoires *via* la voie IKKβ/NFκB. Tpl2 est impliquée dans l'activation de la voie ERK comme réponse spécifique aux stimuli inflammatoires dans les adipocytes et les macrophages. L'activation de l'axe Tpl2/ERK par les cytokines dans les adipocytes est impliquée dans les altérations de la signalisation insulinique et dans l'augmentation de production d'acides gras (lipolyse). Tpl2 est également engagée dans le « dialogue » entre adipocytes et macrophages conduisant à l'augmentation de la production de cytokines inflammatoires, essentiellement par les macrophages.

signalisation qui va inhiber des protéines importantes de la signalisation insulinaire. Plusieurs études cellulaires ont démontré l'importance des MAP kinases dans les altérations de la signalisation insulinaire induites par les cytokines inflammatoires. Divers modèles de souris génétiquement modifiées pour ces kinases ont démontré que leur suractivation au cours de l'obésité participe aux anomalies du contrôle du métabolisme énergétique et au développement de l'insulino-résistance. Ces kinases pourraient donc être de nouvelles cibles pharmacologiques contre la résistance à l'insuline. Cependant, elles sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques et ceci pourrait être un obstacle majeur à leur ciblage pharmacologique pour traiter une maladie chronique comme le diabète. En effet, de nombreux effets secondaires indésirables pourraient apparaître à long terme. Une alternative serait de cibler des activateurs ou des substrats de ces kinases spécifiquement activés par les stress inflammatoires, comme par exemple la kinase Tpl2, que nous avons récemment identifiés comme dérégulés dans le tissu adipeux d'obèses (Jager *et al.*, 2010; Ceppo *et al.*, 2014). Les recherches futures allant dans ce sens nous diront si le ciblage pharmacologique de protéines appartenant au réseau de signalisation inflammatoire activé lors de l'obésité est une stratégie possible pour enrichir l'arsenal thérapeutique contre le diabète et les autres complications de l'obésité.

Remerciements. Les études résumées dans cet article ont reçu le support financier de l'INSERM, l'Université de Nice Sophia Antipolis, le Conseil général des Alpes Maritimes, le Conseil Régional de la Région Provence Alpes-Côte d'Azur, l'Agence Nationale de la Recherche (ANR grant 2010-BLAN-1117-01), la Société Francophone du Diabète (SFD, ex-ALFEDIAM). Franck Ceppo a bénéficié d'un contrat doctoral Région Provence Alpes-Côte d'Azur/INSERM et d'un financement de la SFD.

Références

- Bertola A., Ciucci T., Rousseau D., Bourlier V., Duffaut C., Bonnafe S., Blin-Wakkach C., Anty R., Iannelli A., Gugenheim J., Tran A., Bouloumié A., Gual P., Wakkach A., Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes*, 2012, 61, 2238–2247.
- Biddinger S.B., Kahn C.R., From Mice to Men: Insights into the Insulin Resistance Syndromes. *Annu Rev Physiol*, 2006, 68, 123–158.
- Bost F., Aouadi M., Caron L., Even P., Belmonte N., Prot M., Dani C., Hofman P., Pages G., Pouyssegur J., Le Marchand-Brustel Y., Binétry B., The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for *in vitro* and *in vivo* adipogenesis. *Diabetes*, 2005, 54, 402–411.
- Boura-Halfon S., Zick Y., Serine kinases of insulin receptor substrate proteins. *Vitam Horm*, 2009, 80, 313–349.
- Bouzakri K., Karlsson H.K., Vestergaard H., Madsbad S., Christiansen E., Zierath J.R., IRS-1 Serine Phosphorylation and Insulin Resistance in Skeletal Muscle From Pancreas Transplant Recipients. *Diabetes*, 2006, 55, 785–791.
- Burcelin R. Regulation of metabolism: a cross talk between gut microbiota and its human host. *Physiology (Bethesda)*, 2012, 27, 300–307.
- Carlson C.J., Rondinone C.M., Pharmacological inhibition of p38 MAP kinase results in improved glucose uptake in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Metabolism*, 2005, 54, 895–901.
- Ceppo F., Berthou F., Jager J., Dumas K., Cormont M., Tanti J.-F., Implication of the Tpl2 kinase in inflammatory changes and insulin resistance induced by the interaction between adipocytes and macrophages. *Endocrinology*, 2014, 155, 951–964.
- Dali-Youcef N., Mecili M., Ricci R., Andres E., Metabolic inflammation: connecting obesity and insulin resistance. *Ann Med*, 2013, 45, 242–253.
- Donath M.Y., Shoelson S.E., Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11, 98–107.
- Dumitru C.D., Ceci J.D., Tsatsanis C., Kontoyiannis D., Stamatakis K., Lin J.H., Patriotis C., Jenkins N.A., Copeland N.G., Kollias G., Tsichlis P. N., TNF- α induction by LPS is regulated post-transcriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell*, 2000, 103, 1071–1083.
- Emanuelli B., Eberlé D., Suzuki R., Kahn C.R., Overexpression of the dual-specificity phosphatase MKP-4/DUSP-9 protects against stress-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105, 3545–3550.
- Forsythe L.K., Wallace J.M., Livingstone M.B., Obesity and inflammation: the effects of weight loss. *Nutr Res Rev*, 2008, 21, 117–133.
- Fujishiro M., Gotoh Y., Katagiri H., Sakoda H., Ogihara T., Anai M., Onishi Y., Ono H., Funaki M., Inukai K., Fukushima Y., Kikuchi M., Oka Y., Asano T., MKK6/3 and p38 MAPK pathway activation is not necessary for insulin-induced glucose uptake but regulates glucose transporter expression. *J Biol Chem*, 2001, 276, 19800–19806.
- Fujishiro M., Gotoh Y., Katagiri H., Sakoda H., Ogihara T., Anai M., Onishi Y., Ono H., Abe M., Shojima N., Fukushima Y., Kikuchi M., Oka Y., Asano T., Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*, 2003, 17, 487–497.
- Gallagher E.J., LeRoith D., Insulin, insulin resistance, obesity, and cancer. *Curr Diab Rep*, 2010, 10, 93–100.
- Gantke T., Sriskantharajah S., Ley S.C., Regulation and function of TPL-2, an IkappaB kinase-regulated MAP kinase kinase kinase. *Cell Res*, 2011, 21, 131–145.

- Gantke T., Sriskantharajah S., Sadowski M., Ley S.C. IkappaB kinase regulation of the TPL-2/ERK MAPK pathway. *Immunol Rev*, 2012, 246, 168–182.
- Gregor M.F., Hotamisligil, G.S., Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29, 415–445.
- Gual P., Le Marchand-Brustel Y., Tanti, J.-F., Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*, 2005, 87, 99–109.
- Han M.S., Jung D.Y., Morel C., Lakhani S.A., Kim J.K., Flavell R.A., Davis, R.J., JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science*, 2013, 339, 218–222.
- Henstridge D.C., Bruce C.R., Pang C.P., Lancaster G.I., Allen T.L., Estevez E., Gardner T., Weir J.M., Meikle P.J., Lam K.S., Xu A., Fujii N., Goodyear L.J., Febbraio M.A., Skeletal muscle-specific overproduction of constitutively activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) induces insulin resistance in mice. *Diabetologia*, 2012, 55, 2769–2778.
- Hirosimi J., Tuncman G., Chang L., Gorgun C.Z., Uysal K.T., Maeda K., Karin M., Hotamisligil G.S., A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 2002, 420, 333–336.
- Hotamisligil G.S., Peraldi P., Budavari A., Ellis R., White M.F., Spiegelman B.M., IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*, 1996, 271, 665–668.
- Jager J., Grémeaux T., Cormont M., Le Marchand-Brustel Y., Tanti, J.-F., Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*, 2007, 148, 241–251.
- Jager J., Grémeaux T., Gonzalez T., Bonnafous S., Debard C., Laville M., Vidal H., Tran A., Gual P., Le Marchand-Brustel Y., Cormont M., Tanti, J.-F., The Tpl2 kinase is up-regulated in adipose tissue in obesity and may mediate IL-1 β and TNF- α effects on ERK activation and lipolysis. *Diabetes*, 2010, 59, 61–70.
- Jager J., Corcelle V., Grémeaux T., Laurent K., Waget A., Pagès G., Binétruy B., Le Marchand-Brustel Y., Burcelin R., Bost F., Tanti, J.-F., Deficiency in the extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) protects leptin-deficient mice from insulin resistance without affecting obesity. *Diabetologia*, 2011, 54, 180–189.
- Kaddai V., Le Marchand-Brustel Y., Cormont M., Rab proteins in endocytosis and Glut4 trafficking. *Acta Physiol (Oxf)*, 2008, 192, 75–88.
- Kaddai V., Gonzalez T., Keslair F., Grémeaux T., Bonnafous S., Gugenheim J., Tran A., Gual P., Le Marchand-Brustel Y., Cormont M., Rab4b is a small GTPase involved in the control of the glucose transporter GLUT4 localization in adipocyte. *PLoS One*, 2009, 4, e5257.
- Keshet Y., Seger R., The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol*, 2010, 661, 3–38.
- Lancaster G.I., Kowalski G.M., Estevez E., Kraakman M.J., Grigoriadis G., Febbraio M.A., Gerondakis, S., Banerjee A., Tumor progression locus 2 (Tpl2) deficiency does not protect against obesity-induced metabolic disease. *PLoS One*, 2012, 7, e39100.
- Lebrun P., Van Obberghen E. SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiol (Oxf)*, 2008, 192, 29–36.
- Lee S.J., Pfluger P.T., Kim J.Y., Nogueiras R., Duran A., Pagès G., Pouyssegur J., Tschop M.H., Diaz-Meco M.T., Moscat, J., A functional role for the p62-ERK1 axis in the control of energy homeostasis and adipogenesis. *EMBO Rep*, 2010, 11, 226–232.
- Leto D., Saltiel A.R., Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13, 383–396.
- Lolmède K., Duffaut C., Zakaroff-Girard A., Bouloumié A., Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders. *Diabetes Metab*, 2011, 37, 283–290.
- Mari M., Monzo P., Kaddai V., Keslair F., Gonzalez T., Le Marchand-Brustel Y., Cormont M., The Rab4 effector Rabip4 plays a role in the endocytotic trafficking of Glut 4 in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Sci*, 2006, 119, 1297–1306.
- Morgan B.J., Chai S.Y., Albiston A.L., GLUT4 associated proteins as therapeutic targets for diabetes. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 2011, 5, 25–32.
- Nicholson J.K., Holmes E., Kinross J., Burcelin R., Gibson G., Jia W., Pettersson, S. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 2012, 336, 1262–1267.
- Perfield J.W., 2nd, Lee Y., Shulman G.I., Samuel V.T., Jurczak M.J., Chang E., Xie C., Tschlis P.N., Obin M.S., Greenberg A.S., Tumor progression locus 2 (TPL2) regulates obesity-associated inflammation and insulin resistance. *Diabetes*, 2011, 60, 1168–1176.
- Rask-Madsen C., Kahn, C.R., Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32, 2052–2059.
- Regazzetti C., Peraldi P., Grémeaux T., Najem-Lendom R., Ben-Sahra I., Cormont M., Bost F., Le Marchand-Brustel Y., Tanti J.-F., Giorgetti-Peraldi S., Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes*, 2009, 58, 95–103.
- Rodriguez A., Duran A., Selloum M., Champy M.-F., Diez-Guerra F.J., Flores J.M., Serrano M., Auwerx J., Diaz-Meco M.T., Moscat J., Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab*, 2006, 3, 211–222.
- Sabio G., Davis, R.J., cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35, 490–496.
- Shoelson S.E., Lee J., Yuan M., Inflammation and the IKK β /I κ B/NF- κ B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003, 27 3, S49–S52.
- Solinas G., Vilcu C., Neels J.G., Bandyopadhyay G.K., Luo J.L., Naugler W., Grivennikov S., Wynshaw-Boris

- A., Scadeng M., Olefsky J.M., Karin, M., JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab*, 2007, 6, 386–397.
- Sun S., Ji Y., Kersten S., Qi L., Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annu Rev Nutr*, 2012, 32, 261–286.
- Taniguchi C.M., Emanuelli B., Kahn, C.R., Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7, 85–96.
- Tanti J.-F., Jager, J., Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9, 753–762.
- Tanti J.-F., Grémeaux T., Van Obberghen E., Le Marchand-Brustel, Y., Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *J Biol Chem*, 1994, 269, 6051–6057.
- Tanti, J.-F., Ceppo F., Jager J., Berthou, F., Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 3, 181.
- Vallerie S.N., Furuhashi M., Fucho R., Hotamisligil G.S., A predominant role for parenchymal c-Jun amino terminal kinase (JNK) in the regulation of systemic insulin sensitivity. *PLoS ONE*, 2008, 3, e3151.
- Vernia S., Cavanagh-Kyros J., Barrett T., Jung D.Y., Kim J.K., Davis R. J., Diet-induced obesity mediated by the JNK/DIO2 signal transduction pathway. *Genes Dev*, 2013, 27, 2345–2355.
- White M.F., IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 283, E413–422.
- Wood I.S., de Heredia F.P., Wang B., Trayhurn, P., Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc*, 2009, 68, 370–377.
- Yang R., Trevillyan J.M., c-Jun N-terminal kinase pathways in diabetes. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40, 2702–2706.
- Zhang X., Xu A., Chung S.K., Cresser J.H., Sweeney G., Wong R.L., Lin A., Lam, K.S., Selective inactivation of c-Jun NH2-terminal kinase in adipose tissue protects against diet-induced obesity and improves insulin sensitivity in both liver and skeletal muscle in mice. *Diabetes*, 2011, 60, 486–495.
- Zick Y., Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003, 27, S56–S60.

Résultats non publiés

Implication de Tpl2 dans les effets chimio-attracteurs des adipocytes vis-à-vis des macrophages

Introduction

L'obésité est associée à un état inflammatoire chronique de bas grade, et de nombreuses études mettent en évidence l'implication de l'inflammation et les dysfonctions du tissu adipeux dans le développement de la résistance à l'insuline au niveau local et systémique. Le tissu adipeux d'individus obèses fait l'objet de l'infiltration de cellules immunitaires tels que les macrophages, et cette infiltration participe activement aux dysfonctions de ce tissu observées lors de l'obésité. En effet, il est suggéré l'existence d'un dialogue entre les macrophages et les adipocytes au sein du tissu adipeux, participant à la mise en place d'une boucle paracrine inflammatoire associée à une résistance à l'insuline des adipocytes.

Les adipocytes hypertrophiés présent dans le tissu adipeux d'individus obèses participent au recrutement des macrophages *via* la production de chimiokines et autres facteurs ayant des potentiels attractant. En effet, le Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1 ou CCL2) est bien décrit pour participer à l'attraction des macrophages dans le tissu adipeux lors de l'obésité (Chen et al., 2005; Christiansen et al., 2005; Dahlman et al., 2005; Kim et al., 2006 ; Yu et al., 2006). Les adipocytes sont capables de sécréter de nombreux autres facteurs ayant des capacités chimio-attractantes vis-à-vis des macrophages tels que certaines chimiokines, la chémérine ou l'ostéopontine (Bertola et al., 2009 ; Chavey et al., 2009 ; Keophiphath et al., 2010 ; Kim et al., 2014 ; Mothe-Satney et al., 2012 ; Nara et al., 2007 ; Xueyao et al., 2014). Des médiateurs lipidiques comme les leukotriènes ou les prostaglandines peuvent également être sécrétés par les adipocytes et sont impliqués ou potentiellement impliqués dans l'attraction des macrophages dans le tissu adipeux.

L'obésité est également associée à une modification de la flore intestinale qui a pour conséquence une élévation des taux circulants du Lipopolysaccharide (LPS) (Cani et al., 2007). Le LPS est un ligand du Toll Like Recepteur 4 (TLR4) présent notamment au niveau des

macrophages, et pourrait jouer un rôle dans l'activation et la migration des macrophages. L'identification des voies de signalisations et les mécanismes impliqués dans l'attraction des macrophages dans le tissu adipeux s'avère être important afin de développer de nouvelles stratégies pour diminuer de l'inflammation de ce tissu.

La kinase Tpl2 est retrouvée surexprimé dans le tissu adipeux de souris et patients obèses (Jager et al., 2010). *In vitro* Tpl2 est impliquée dans les effets inflammatoires qui résultent du dialogue entre adipocytes et macrophages, en participant notamment à la production du Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1). Une étude *in vivo* récente implique Tpl2 dans la migration des macrophages dans la cavité péritonéale induite par le thioglycollate, notamment en régulant l'expression de certains récepteurs aux chimiokines (Rowley et al., 2014). Différentes études ont été réalisées sur les souris invalidées pour Tpl2 soumise à un régime riche en graisse. Il en ressort des résultats contradictoires au niveau de l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux. En effet, une étude trouve une diminution de l'inflammation et de l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux par rapport aux souris sauvages (Perfield et al., 2011). Cependant les deux autres études ne trouvent pas de différences au niveau de l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux, même si dans une de ces études ce tissu présente moins d'inflammation que les souris sauvages (Lancaster et al., 2012). L'implication de Tpl2 dans la sécrétion de facteurs chimio-attractants et dans le potentiel migratoire des macrophages reste donc à être déterminé.

Nos résultats indiquent qu'*in vitro* Tpl2 est impliquée dans la production de facteurs chimio-attractants par les adipocytes situés dans un contexte inflammatoire. L'inhibition de Tpl2 par un inhibiteur pharmacologique et par ARN interférents dans les adipocytes permet de diminuer l'expression d'un certains nombres de facteurs chimio-attractants ainsi que le potentiel migratoire des macrophages.

Matériels et méthodes

Culture cellulaire

Les adipocytes sont utilisés dans les 10 jours qui suivent le début de la différenciation. Les macrophages Raw 264.7 sont cultivés dans du DMEM contenant 5% de SVF décomplementé et des antibiotiques à 37°C, 5% CO₂ et 95% air atmosphérique.

Les macrophages Raw Blue expriment la phosphatase alcaline sous un promoteur contrôlé par les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1. Lors de l'activation de ces facteurs de transcription la phosphatase est sécrétée dans le milieu de culture, et son dosage reflète l'activation de NF- κ B et/ou AP-1.

Préparation des macrophages dérivés de la moelle osseuse

La moelle osseuse est isolée à partir du tibia et du fémur de souris male C57BL/6J (Charles River Laboratoires) comme décrit (Nguyen et al., 2007). Les souris sont tuées par dislocation cervicale, et les cellules de la moelle osseuse sont resuspendues dans du DMEM contenant 30% de milieu conditionné de L-929 (contenant le facteur de différenciation MCSF), 20% SVF décomplementé et des antibiotiques. Les cellules sont différenciées et prêtes à être utilisées après 7 jours.

Migration des macrophages

Les macrophages (2.5×10^5 dans 0,25ml) sont ensemencés, dans DMEM contenant 0,5% SVF, dans des chambres de migration (BD, 24 puits, pores 8 μ m) situées au dessus d'adipocyte 3T3-L1 différenciés (3×10^5 dans 0,25ml) incubés dans du milieu DMEM contenant 0,5% SVF avec le véhicule (DMSO) ou l'inhibiteur de Tpl2 (10 μ M). Après 16h de migration les chambres de migration sont rincées en PBS, fixées durant 20 min en PFA 4%, colorées au cristal violet, décolorées pour éliminer l'excédant de colorant puis les macrophages n'ayant pas migrés sont éliminés avec un coton.

Pour la migration des macrophages induite par les milieux conditionnés (CM) d'adipocytes, comme précédemment les macrophages sont ensemencés dans les chambres de migration en présence de CM (0,4 ml).

En contrôle les macrophages sont ensemencés dans des chambres de migration situées dans des puits sans adipocytes dans du DMEM contrôle. Les macrophages sont ensuite comptés au grossissement X40, avec quatre photos par condition.

Tpl2 est invalidé dans les adipocytes 3T3-L1 (3×10^5 en 24 puits) en utilisant un siARN contre Tpl2 (50nM) et la lipofectamine RNAiMAX par reverse transfection. Après 24h de transfection l'expérience de migration est lancée comme indiqué ci-dessus.

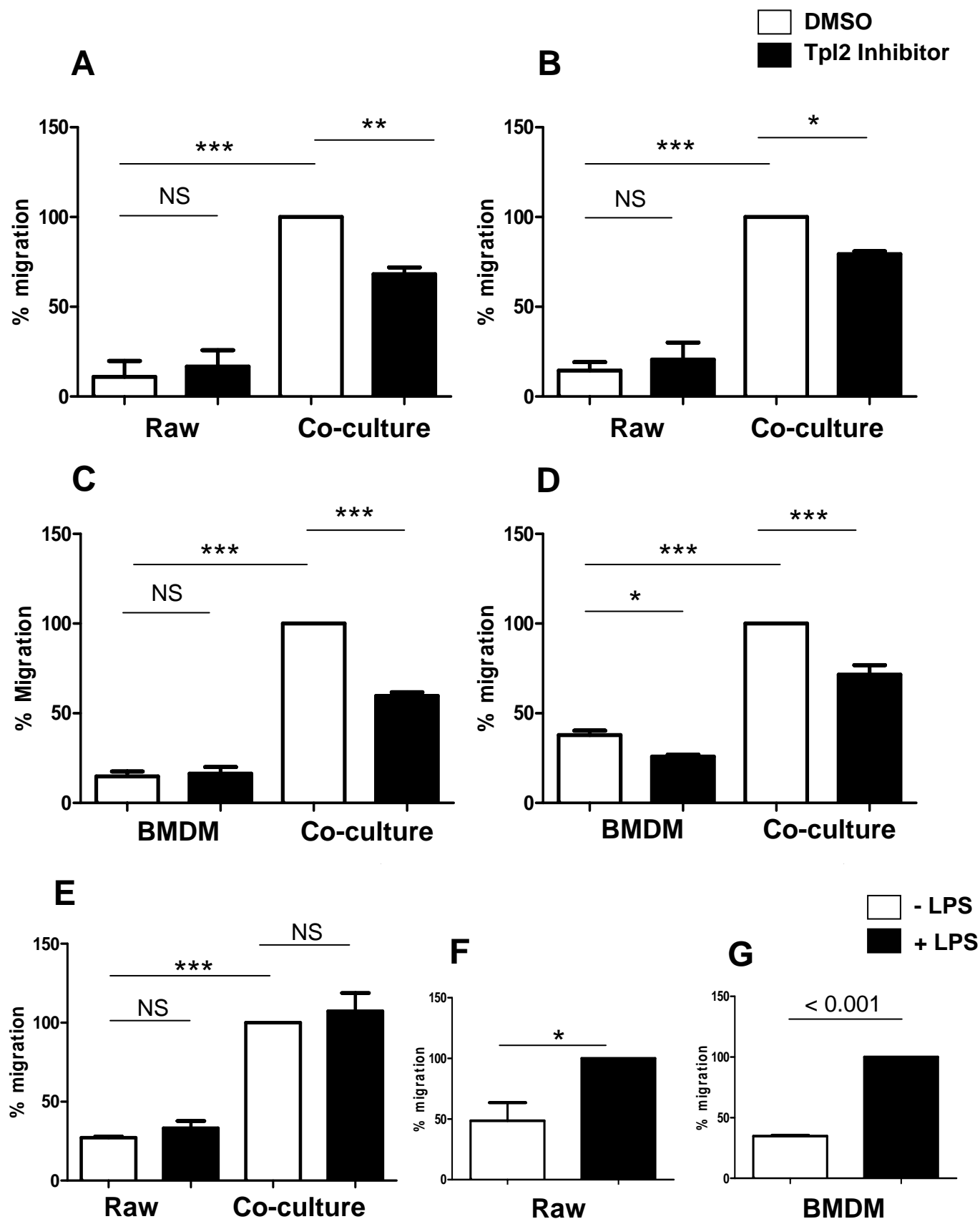


Figure 1 : Implication de Tpl2 dans l'induction de la migration des macrophages par les adipocytes

Migration des macrophages Raw en condition de co-culture avec les adipocytes en absence (A) ou en présence (B) de LPS. Migration des BMDM de type M2 en co-culture avec les adipocytes en absence (C) ou en présence (D) de LPS. (E) Migration des Raw en condition de co-culture avec les pré-adipocytes. (F) Migration de macrophages Raw induite par le LPS. (G) Migration des BMDM M2 induite par le LPS.

Co-culture des adipocytes et macrophages

Les macrophages (5×10^5) sontensemencés, dans du DMEM contenant 0,5% SVF, dans des chambres (BD, 12 puits, pores $0,4\mu\text{m}$) situées au dessus d'adipocytes 3T3-L1 différenciés (6×10^5) incubés dans du DMEM contenant 0,5% SVF avec du DMSO ou l'inhibiteur de Tpl2 ($10\mu\text{M}$). En contrôle les macrophages et adipocytes sont cultivés de manière indépendante, traités dans les mêmes conditions. Après 20h, les cellules sont lysées pour extraire les ARNm, et les milieux utilisés pour quantifier le glycerol par un test colorimétrique (GPO-Trinder ;Sigma) e qui est un index de la lipolyse

Milieux conditionnés d'adipocytes

Les adipocytes 3T3-L1 ($1,2 \times 10^6$, en 6 puits) sont stimulés dans du DMEM 5% SVF par le véhicule (DMSO) ou l'inhibiteur de Tpl2 ($5\mu\text{M}$) pendant 2h, puis stimulés par des cytokines ($\text{TNF-}\alpha$ 20ng/ml ou $\text{IL-1}\beta$ 20ng/ml) ou du LPS (0,5 ng/ml ou 100 ng/ml) pendant 24h. Les adipocytes sont lavés puis incubés durant 24h avec dans DMEM 0,5% SVF, les CM sont ensuite utilisés pour induire la migration des macrophages.

Analyse statistique

L'analyse statistique est réalisée par le logiciel GraphPad PRISM 5. Les différences entre les groupes sont analysées par un test ANOVA suivi d'un test post hoc. $P < 0.05$ est considéré comme statistiquement différent.

Résultats

Implication de Tpl2 dans les effets chimio-attracteurs des adipocytes induit par le dialogue entre les adipocytes et les macrophages.

Lorsque les macrophages Raw sont placés en condition de co-culture avec des adipocytes, on observe une augmentation de leur capacité migratoire (Figure 1a). L'inhibition de Tpl2 dans les macrophages et les adipocytes permet une diminution de la migration induite par la co-culture. Il est intéressant de noter que l'inhibition de Tpl2 dans les macrophages à l'état basal n'induit aucun changement dans leurs capacités migratoires. Chez les individus obèses on retrouve une augmentation des niveaux circulants de LPS, qui pourrait participer à l'activation et l'attraction des macrophages dans le tissu adipeux. En effet, Le LPS seul augmente de manière significative la migration basale des macrophages Raw (Figure 1f).

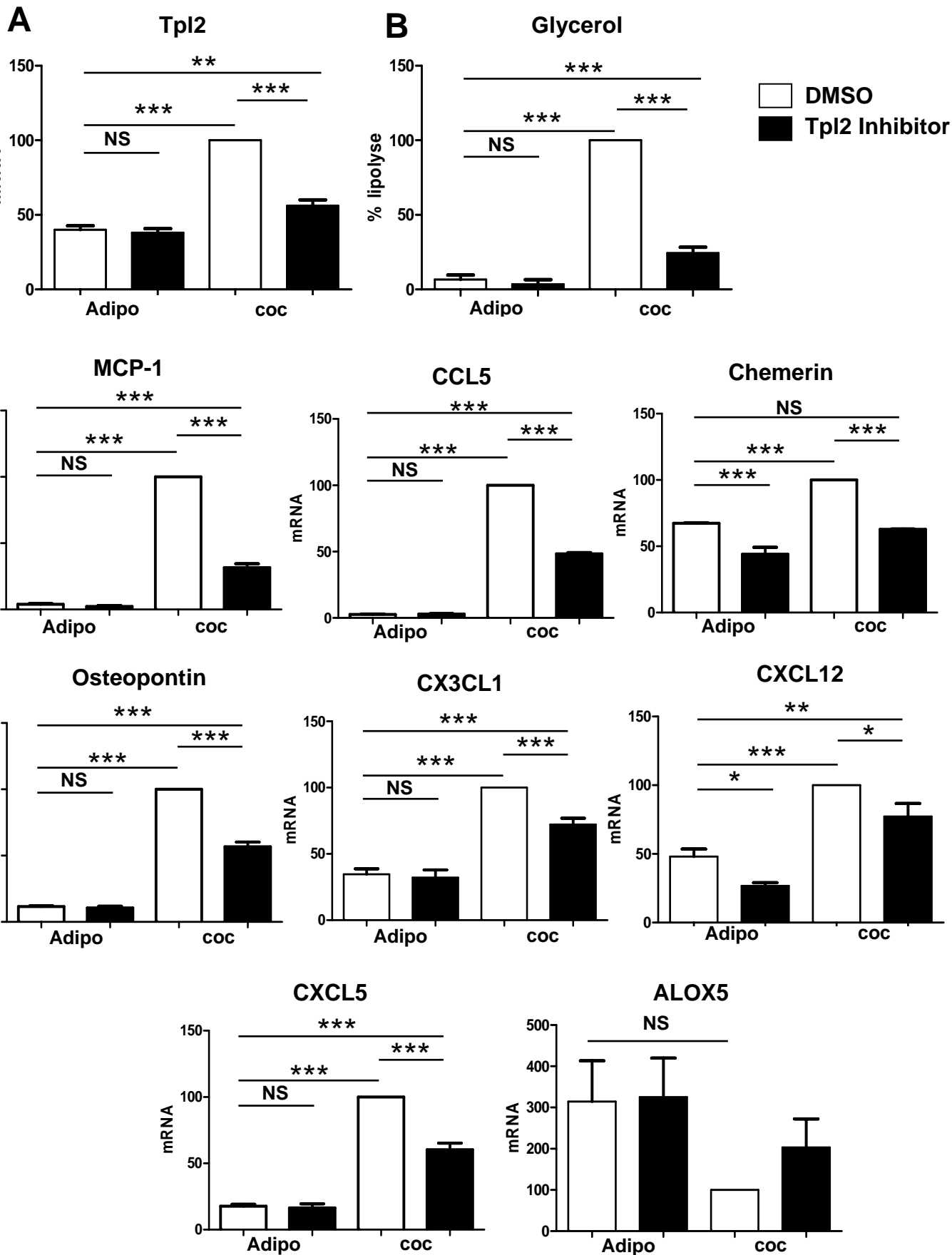


Figure 2 : Tpl2 régule la lipolyse et expression de différents gènes dans les adipocytes en :co-culture en absence de LPS

Les macrophages Raw sont co-cultivés avec les adipocytes en absence (histogramme blanc) ou en présence (histogramme noir) de l'inhibiteur de Tpl2. (A) Expression de la kinase Tpl2. (B) Lipolyse indiquée par le mesure du glycérol dans le milieu. (C) Expression de différentes chimiokines et facteurs ayant un potentiel chimio-attractants.

Lorsque les macrophages sont placés en présence des adipocytes et du LPS on induit une augmentation de leur migration qui est partiellement inhibée par l'inhibition pharmacologique de Tpl2. Ces résultats sont retrouvés lorsqu'on utilise des macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris sauvages (BMDM) et dérivés en type anti-inflammatoires (M2) (Figure 1c, 1d, 1g). Cependant l'inhibition de Tpl2 impacte la migration des macrophages primaires induite par le LPS mais n'a pas d'effet sur la migration de la lignée Raw (Figure 1b et 1d). Afin de déterminer si l'induction de migration est spécifiquement due aux adipocytes nous avons étudié la migration des macrophages en présence de pré-adipocytes. Les pré-adipocytes sont également capables d'attirer les macrophages, mais avec une plus faible induction que les adipocytes, et cette capacité chimio-attractante est indépendante de l'activation de Tpl2 (Figure 1e).

La co-culture avec les macrophages induit une lipolyse dans les adipocytes qui est inhibée en présence de l'inhibiteur de Tpl2, les acides gras libérés pourraient ainsi participer à l'activation et l'attraction des macrophages (Figure 2b). De plus, la co-culture induit une augmentation d'expression de Tpl2 dans les adipocytes, ainsi que l'augmentation d'expression de nombreuses chimiokines et facteurs ayant des potentiels attractants vis-à-vis des macrophages (Figure 2a et 2c). En effet, on observe une augmentation de l'expression génique de MCP-1, CCL5, CXCL5, CXCL12 et CX3CL1 mais également d'autres facteurs tels que la chemérine et de l'ostéopontine. Il est intéressant de noter que la co-culture ne semble pas induire la production de leucotriènes et pourrait même la réprimer, comme l'indique la diminution d'expression de l'enzyme Alox5, nécessaire à leur synthèse. Tous ces facteurs jouent certainement un rôle prépondérant dans l'induction de la migration des macrophages. En effet, Lorsque Tpl2 est inhibé pharmacologiquement on observe une diminution significative de la lipolyse accompagnée de la diminution de l'expression des chimiokines et facteurs chimio-attractants précédemment cités (Figure 2).

Cependant l'inhibiteur pharmacologique de Tpl2 est capable d'agir à la fois sur les adipocytes et sur les macrophages. Les effets observés pourraient donc s'expliquer soit par la diminution de la production de facteurs chimio-attractants par les adipocytes soit par la diminution de l'activation et des capacités migratoires des macrophages en réponse aux stimuli. Pour étudier spécifiquement l'implication de Tpl2 dans la production de facteurs chimio-attractants nous avons inhibés spécifiquement Tpl2 dans les adipocytes par l'utilisation d'ARN interférents. On observe ainsi que la migration des macrophages Raw et

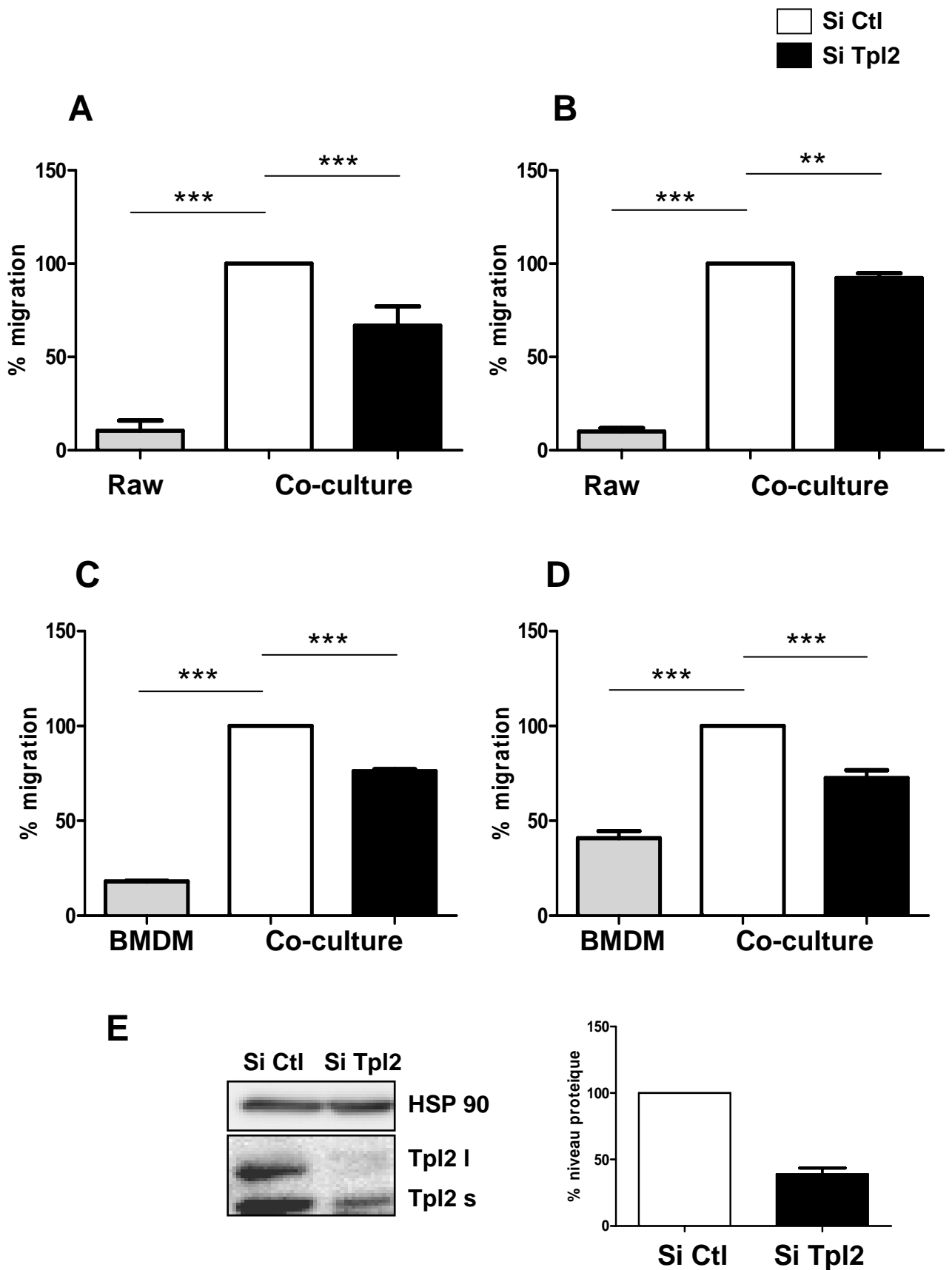


Figure 3 : L'invalidation de Tpl2 dans les adipocytes diminue la migration des macrophages induite par la co-culture

Migration des macrophages Raw en condition de co-culture avec des adipocytes traités avec un siARN contrôle (histo blanc) ou un siARN contre Tpl2 (histo noir) en absence (A) ou en présence (B) de LPS. Migration des BMDM de type M2 en co-culture avec des adipocytes en absence (C) ou en présence (D) de LPS. (E) Niveaux protéiques de Tpl2 dans les adipocytes.

des BMDM, induite par la co-culture en présence ou en absence de LPS, est partiellement inhibée lorsque Tpl2 est invalidé dans les adipocytes (Figure 3). Ceci semble démontrer que la production de facteurs chimio-attractants par les adipocytes est majoritairement responsable de la diminution de migration des macrophages observée lorsque Tpl2 est inhibé pharmacologiquement. Dans ce sens on retrouve une inhibition de l'expression des différents facteurs précédemment cités et de la lipolyse dans les adipocytes lors de l'invalidation de Tpl2 (Figure 4). Il est à noter que la chimiokine CXCL12 ne semble pas être régulée par Tpl2 dans les adipocytes et qu'elle doit donc jouer un rôle mineur dans l'induction de la migration des macrophages.

Nos précédents résultats indiquaient que la co-culture directe entre macrophages et adipocytes induit une augmentation de sécrétion et d'expression des cytokines $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6 et PAI-1, et cette augmentation est partiellement dépendante de l'activation de Tpl2. La co-culture sans contact permet de mettre en évidence que l'augmentation d'expression de ces cytokines est retrouvée à la fois dans les adipocytes et les macrophages, sauf pour l'IL-6, et que l'inhibition de Tpl2 induit une diminution d'expression de ces cytokines dans les deux types cellulaires (Figure 5a et 5b). Les Raw Blue ont la particularité de produire la phosphatase alcaline lors de l'activation des facteurs de transcription inflammatoires NF- κ B et/ou AP-1. Lorsque ces Raw Blue sont placés en condition de co-culture on observe une production de la phosphatase alcaline, ce qui par conséquent implique l'activation des facteurs cités précédemment. De manière intéressante, l'activation de ces voies inflammatoires est bloquée lorsque Tpl2 est inhibé pharmacologiquement (Figure 5c).

Les macrophages peuvent se trouver dans différents états inflammatoires, un profil anti-inflammatoire (M2) ou un profil pro-inflammatoire (M1). Les macrophages Raw pré-stimulés avec du LPS, et donc orienté vers un profil M1, démontrent également une augmentation de leur migration en présence des adipocytes. L'inhibition de Tpl2 induit une diminution de la migration induite sans impacter la migration basale des macrophages (Figure 6a). On remarque que l'induction de la migration des macrophages M1 par les adipocytes est comparable à celle des macrophages M2. Cependant la migration basale des macrophages M1 est largement inférieure à celle des macrophages M2, laissant penser que les macrophages pro-inflammatoires ont un défaut dans leurs capacités migratoires (Figure 6b). L'implication de Tpl2 dans la migration induite par les adipocytes est retrouvée lorsqu'on

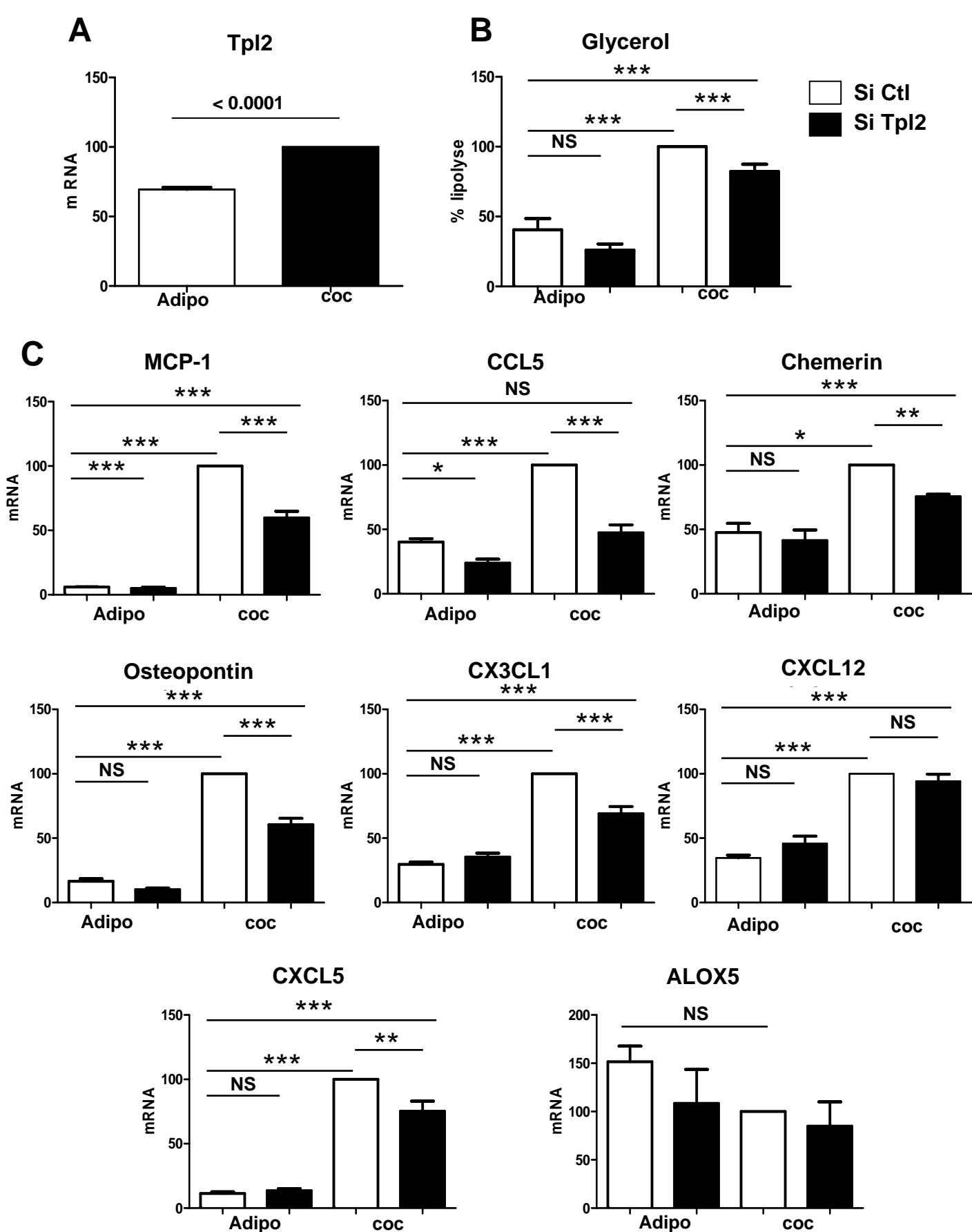


Figure 4 : L'inactivation de Tpl2 dans les adipocytes inhibe partiellement l'induction de la lipolyse et de l'expression des différents facteurs attractants
 Les macrophages Raw sont co-cultivés avec les adipocytes traités avec un siARN contrôle (histo blanc) ou un siARN contre Tpl2 (histo noir). **(A)** Expression de la kinase Tpl2. **(B)** Lipolyse indiquée par le mesure du glycérol dans le milieu. **(C)** Expression de différentes chimiokines et facteurs ayant un potentiel chimio-attractants.

étudie la migration des macrophages dérivés de la moelle osseuse en profil pro-inflammatoire (Figure 6c). Il est intéressant de noter que l'induction de la migration par les adipocytes est inférieure à celle observée avec les BMDM M2, renforçant l'idée d'une plus faible capacité migratoire de ces macrophages.

Implication de Tpl2 dans les effets chimio-attracteurs des adipocytes stimulés avec des agents diabétogènes.

La stimulation des adipocytes avec le TNF- α et l'IL-1 β , deux cytokines inflammatoires, active des voies de signalisation inflammatoires au niveau des adipocytes aboutissant à la sécrétion de nombreux facteurs dont certains ayant des potentiels chimio-attracteurs. En effet, on observe une augmentation des capacités migratoires des macrophages lorsqu'ils sont incubés avec des milieux conditionnés d'adipocytes stimulés avec ces cytokines. Lorsque Tpl2 est inhibé soit pharmacologiquement soit spécifiquement dans les adipocytes suite à l'utilisation d'ARN interférents, les milieux conditionnés sont moins capables d'induire la migration des macrophages (Figure 7a, b, c et d).

Ces résultats suggèrent que dans les adipocytes l'activation de Tpl2 en réponse aux cytokines participe à la production de chimiokines ou facteurs chimio-attractants. Un milieu conditionné d'adipocytes stimulés avec du LPS est également capable d'induire la migration des macrophages, et l'activation de Tpl2 dans les adipocytes est important dans ce processus (Figure 7e et 7f). La stimulation des adipocytes par les cytokines inflammatoires induit une lipolyse avec une tendance à la baisse non significative lorsque Tpl2 est inhibée (Figure 8a, b, c et d), tandis que LPS n'induit pas de lipolyse par les adipocytes (Figure 8e et f). Il semble donc que les effets observés lors de l'inhibition de Tpl2 dans la migration induite par les milieux conditionnés d'adipocytes stimulés avec des facteurs diabétogènes soit indépendants des acides gras sécrétés. De plus, les macrophages incubés avec ces milieux conditionnés ne présentent pas d'activité des facteurs de transcription NF- κ B et/ou AP-1, indiquant une différence dans les sécrétions des adipocytes entre la co-culture et la stimulation par des agents diabétogènes (Figure 8g et h).

L'étude des expression des facteurs chimio-attractants les plus augmentés en co-culture, suggèrent que CCL5 et MCP-1 sont les principaux acteurs dans la migration des macrophages induite par les adipocytes stimulés avec du TNF α et du IL-1 β (Figure 9a et b). Les adipocytes stimulés par le LPS présentent également une augmentation de CCL5 et MCP-1

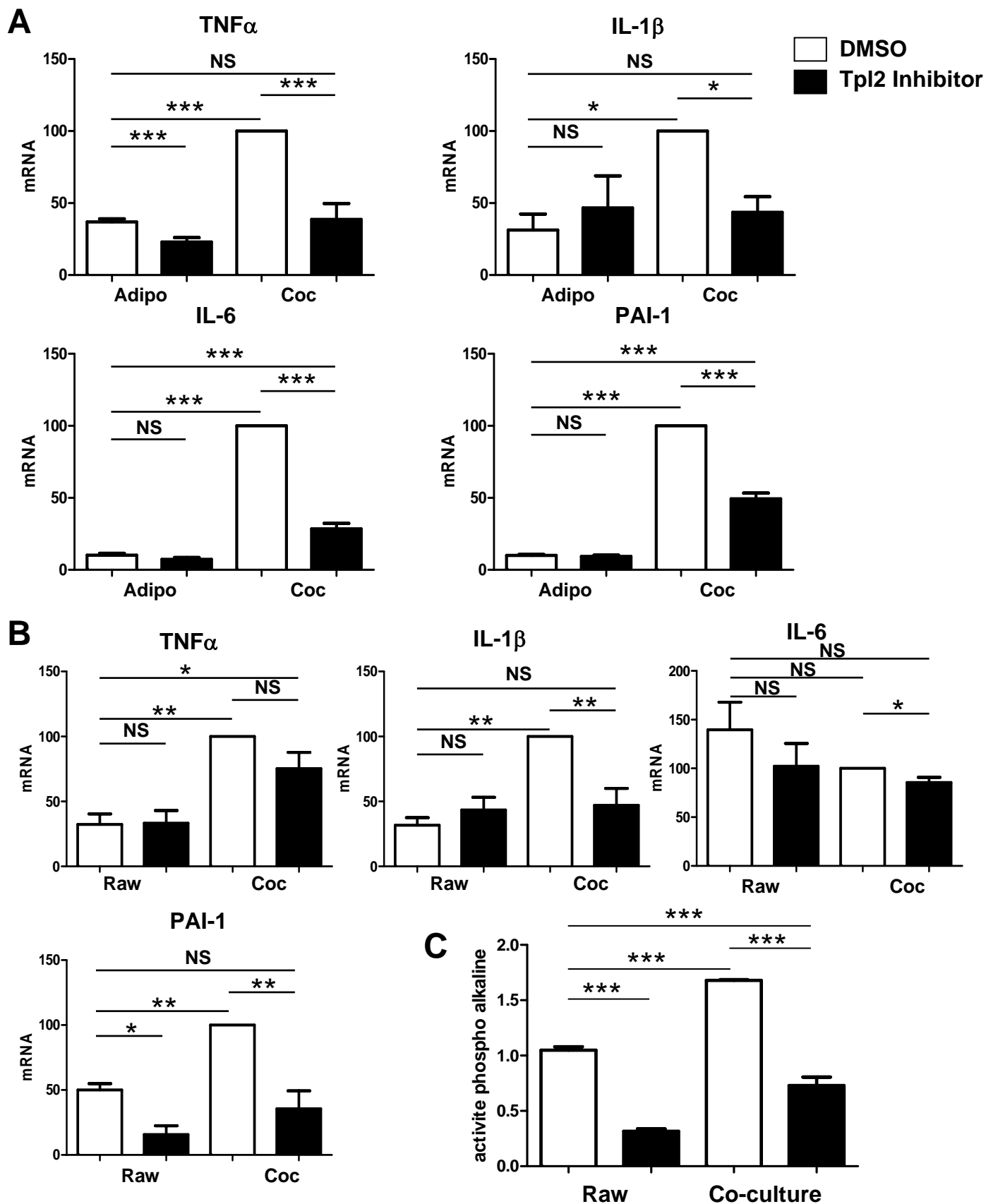


Figure 5 : L'inhibition de Tpl2 prévient l'induction de l'expression de différentes Cytokines induit par la co-culture entre les adipocytes et les macrophages.

Les macrophages Raw sont co-cultivés avec les adipocytes en absence (histo blanc) ou an presence (histo noir) d'un inhibiteur de Tpl2. Expressions de différentes cytokines dans les adipocytes (**A**) ou dans les macrophages (**B**). (**C**) Production de la phosphatase alcaline par les macrophages Raw Blue.

mais celle-ci est indépendante de l'activation de Tpl2. Ces résultats semblent indiquer que la diminution de migration observée lors de l'inhibition de Tpl2 dans les adipocytes stimulés avec du LPS est indépendante des chimiokines CCL5 et MCP-1. D'autre part, la chimiokine CX3CL1 et l'ostéopontine ne semblent faire partie des facteurs impliqués dans la migration des macrophages et régulés par Tpl2.

Conclusion

Les sécrétions basales de médiateurs inflammatoires par les adipocytes et les macrophages initient un dialogue entre ces deux types cellulaires aboutissant l'augmentation d'expression de cytokines pro-inflammatoires à la fois dans les adipocytes et dans les macrophages. Associé à cet état inflammatoire, les adipocytes produisent également des facteurs chimio-attractants induisant la migration des macrophages. De même, la stimulation des adipocytes par des facteurs diabétogènes induit la production de médiateurs impliqués dans l'attraction des macrophages.

L'ensemble de ces résultats suggère que suivant la stimulation, les adipocytes vont produire différents facteurs capables d'attirer les macrophages et qu'il s'agit d'un mécanisme complexe faisant intervenir une combinaison de plusieurs acteurs. Ceci est fortement suggéré par les nombreuses études *in vivo* avec des souris invalidées spécifiquement pour des chimiokines et montrant des résultats contradictoires.

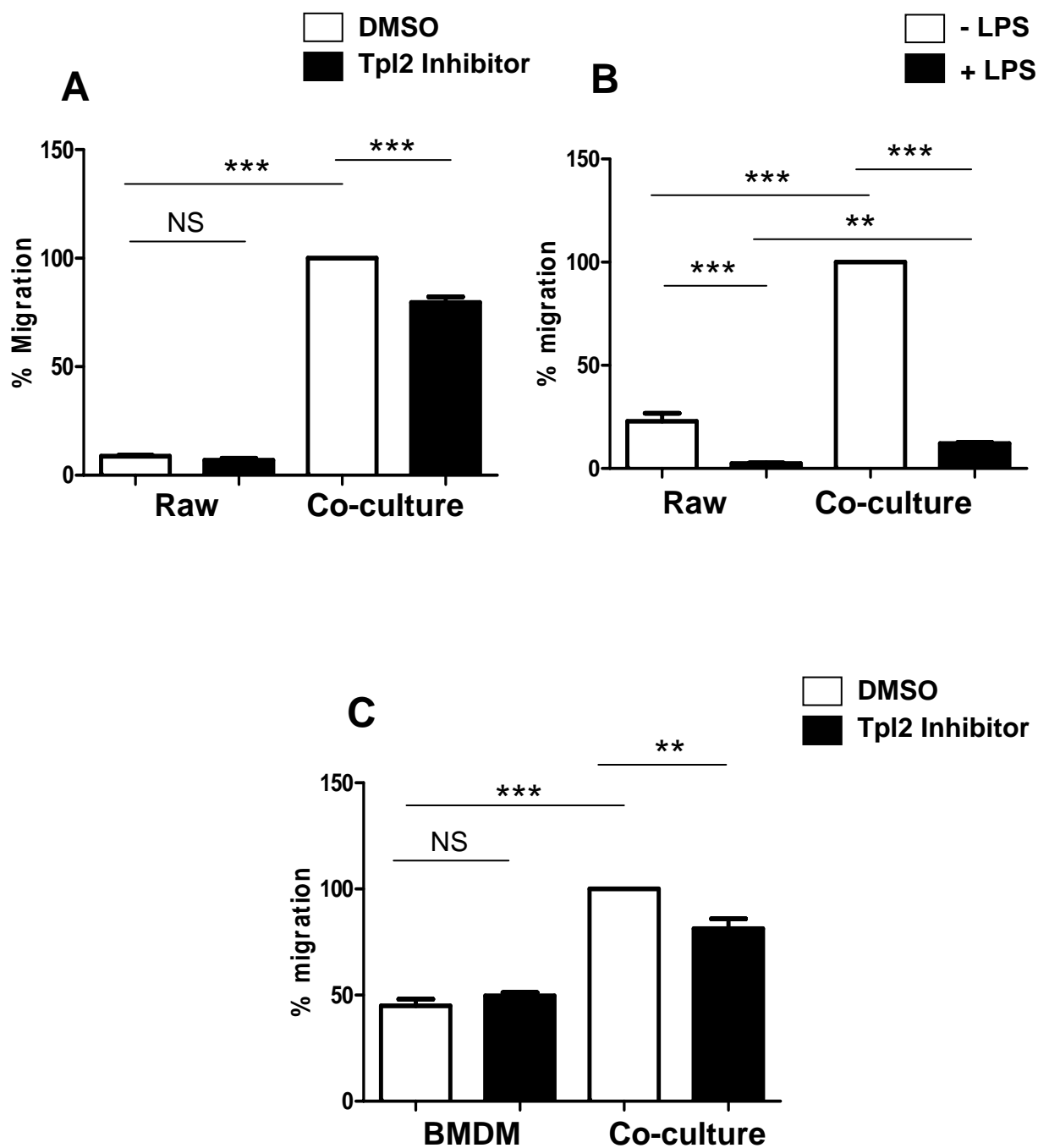


Figure 6: Migration des macrophages pro-inflammatoires

(A) Migration des macrophages Raw pré-stimulés avec du LPS en présence des adipocytes. (B) Comparaison de la migration des Raw pré-stimulés ou non avec du LPS. (C) Migration des BMDM de type M1 en co-culture.

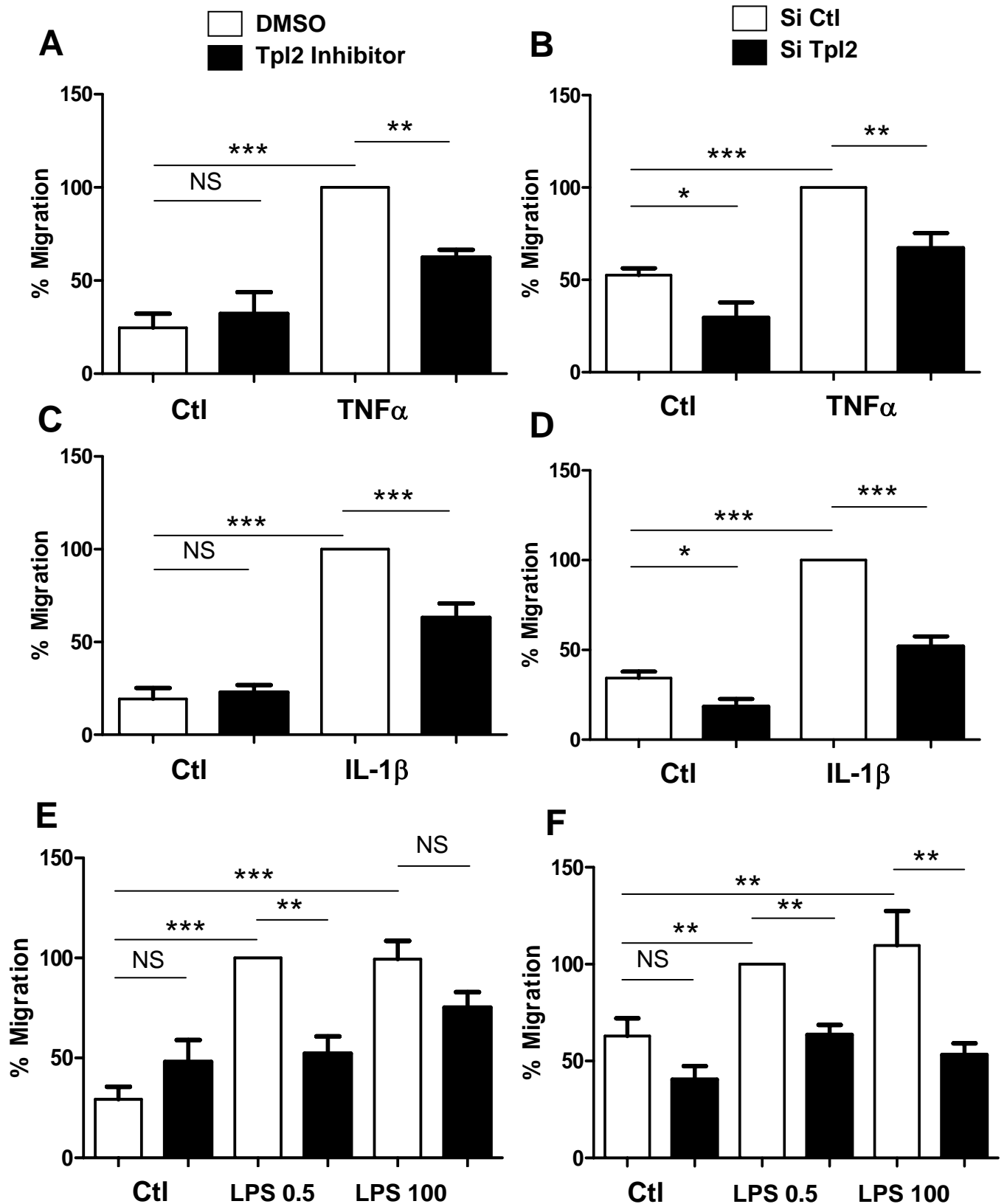


Figure 7 : Implication de Tpl2 dans le potentiel chimio-attractant du sécrétome d'adipocytes

Migration des macrophages Raw incubés avec un milieu conditionné d'adipocytes stimulés avec du TNF- α (A), de l'IL-1 β (C) ou du LPS (E) en absence (histo blanc) ou en présence (histo noir) de l'inhibiteur pharmacologique de Tpl2. Migration des macrophages incubés dans des milieux conditionnés d'adipocytes invalidés ou non pour Tpl2 et stimulés avec du TNF- α (B), de l'IL-1 β (D) ou du LPS (F).

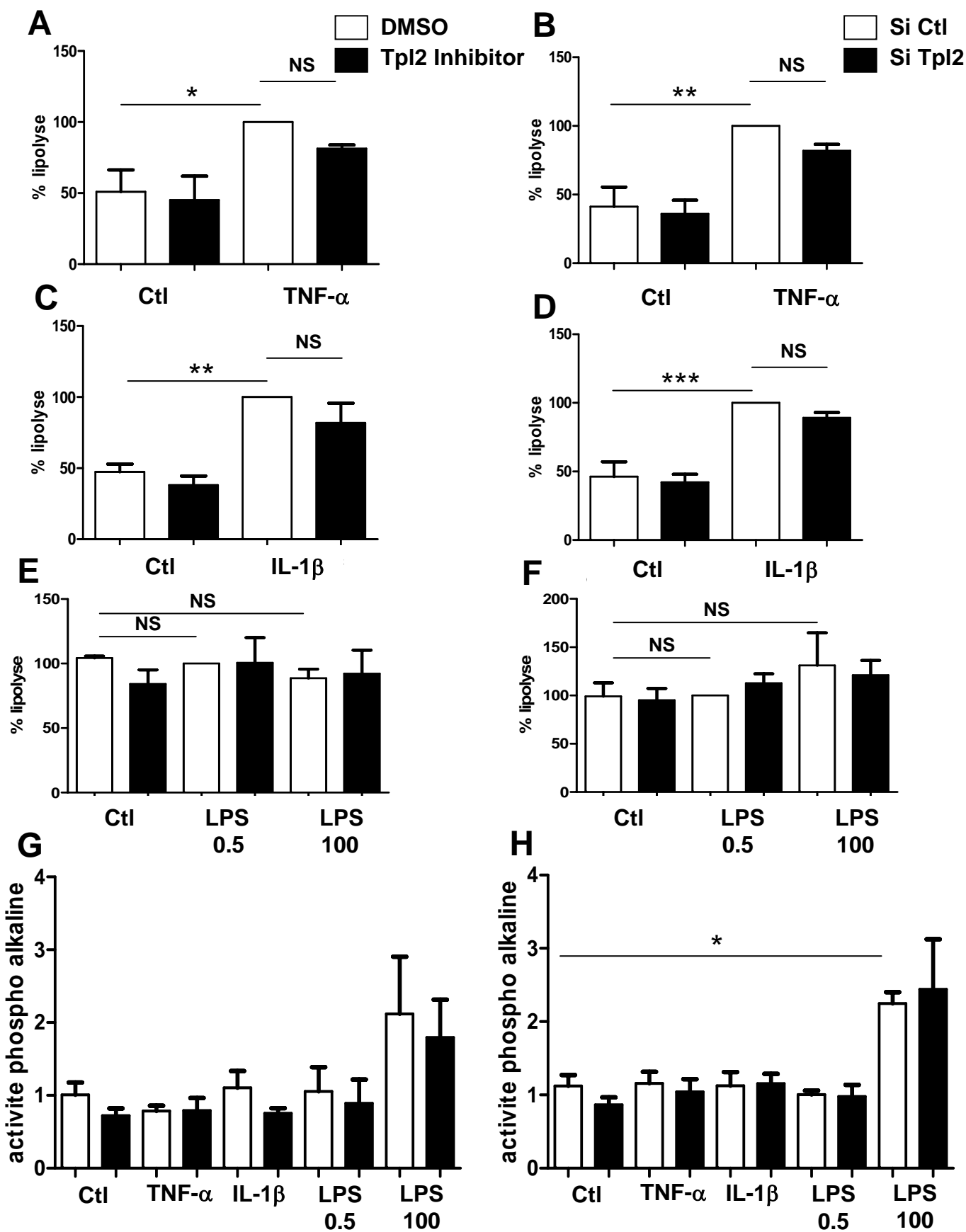


Figure 8 : Augmentation de la lipolyse dans les milieux conditionnés d'adipocytes et activation des macrophages

Étude de la lipolyse induite par le TNF α (A et B), l'IL-1 β (C et D) ou le LPS (E et F) dans les adipocytes. (G et H) Production de la phosphatase alcaline par les macrophages Raw Blue incubés avec les milieux conditionnés d'adipocytes.

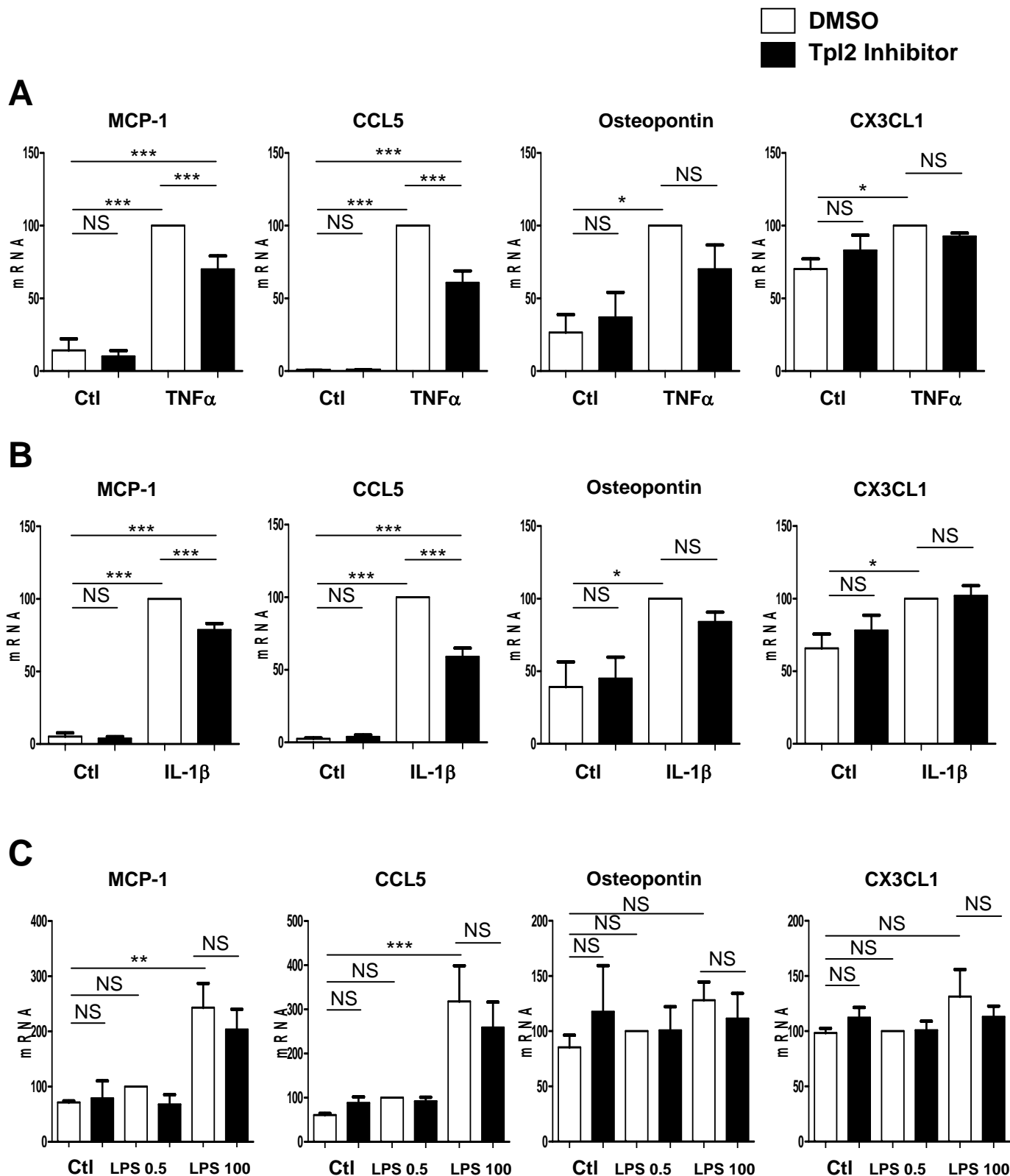


Figure 9 : L'inhibition de Tpl2 prévient partiellement l'induction des certains facteurs chimio-attractants dans les adipocytes induit par les cytokines

Étude de l'expression de différents facteurs chimio-attractants dans les adipocytes stimulés par le TNFα (A), l'IL-1β (B) et le LPS (C) en absence (histo blanc) ou en présence (histo noir) d'un inhibiteur de Tpl2.

Implication de Tpl2 dans l'inflammation du tissu adipeux associée à l'hypoxie

Introduction

L'obésité est associée à un état inflammatoire chronique de bas grade, et de nombreuses études mettent en évidence l'implication de l'inflammation et les dysfonctions du tissu adipeux dans le développement de la résistance à l'insuline au niveau local et systémique.

Lors de l'obésité, le tissu adipeux subit une expansion importante résultant principalement de l'augmentation de la taille des adipocytes, qui s'accompagne de l'apparition de zones hypoxiques. Ce phénomène est bien retrouvé dans le tissu adipeux de rongeurs soumis à une alimentation riche en graisse ou génétiquement obèse, mais est remis en question chez l'homme (Goossens et al., 2011; Hodson et al., 2013). Plusieurs études suggèrent que l'hypoxie pourrait être associée à un état inflammatoire. En effet, *in vitro* l'hypoxie induit la sécrétion d'adipokines pro-inflammatoires telles que la leptine, le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et le TGF β à la fois par les adipocytes et par les macrophages, et induit également la baisse de sécrétion d'adipokines anti-inflammatoire telle que l'adiponectine (Kunduzova et al., 2008 ; Ye, 2009 ; Ye et al., 2007). L'augmentation de la production des cytokines provient principalement de la régulation de l'activité de NF- κ b et C/EBP par l'hypoxie (Teng et al., 2002). D'autres part, les voies de stress des MAP kinases sont activées en réponse à l'hypoxie dans le tissu adipeux et participent à la sécrétion de ces cytokines pro-inflammatoires par la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux (O'Rourke et al., 2011). Le MCP-1 est aussi augmenté lors de l'hypoxie suggérant que l'hypoxie pourrait participer à l'infiltration du tissu adipeux par les macrophages. En accord avec cette hypothèse, il a été montré par immuno-marquage que les zones hypoxiques du tissu adipeux sont riches en cellules immunitaires (Rausch et al., 2008). Ces cellules immunitaires recrutées dans les zones hypoxiques pourraient contribuer à la réaction inflammatoire mais aussi au remodelage du tissu adipeux et à son adaptation à l'hypoxie.

La réponse à l'hypoxie est régulée en majorité par le facteur de transcription HIF (Hypoxia Inductible Factor). Il s'agit d'un hétérodimère constitué d'une sous-unité α et d'une sous-unité β constitutivement présente. En conditions normoxiques, les protéines α sont très peu

détectées puisqu'elles sont hydroxylées par des prolyl hydroxylases et rapidement dégradées par le protéasome (Moroz et al., 2009). La principale régulation de HIF par l'oxygène s'effectue au niveau de la stabilité de la sous-unité α qui est l'élément principal responsable de l'augmentation de HIF en hypoxie. Au travers de l'activité de HIF, l'hypoxie contribue à la régulation de nombreux gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire participant ainsi au développement de la fibrose du tissu adipeux. L'ensemble des études actuelles suggère donc que l'hypoxie en modulant le microenvironnement des adipocytes pourrait être un facteur important dans l'inflammation et la dysfonction du tissu adipeux contribuant ainsi à l'insulinorésistance.

La kinase inflammatoire Tpl2 est retrouvée surexprimée dans le tissu adipeux de souris et patients obèses (Jager et al., 2010). Cette kinase est décrite pour intervenir dans de nombreux phénomènes inflammatoires et est potentiellement capable d'activer indirectement l'ensemble des MAP kinases mais également de réguler l'activité de certains facteurs de transcription comme c-FOS, AP-1 ou encore NF- κ B (Chiariello et al., 1999 ; Choi et al., 2008). Différents stimuli sont capables d'activer Tpl2, c'est le cas de certains stress cellulaires (Stress génotoxiques, osmotiques ou oxydatifs), les ligands des TLR (Toll Like Receptor) ou du CD40, certains récepteur couplés aux protéines G (RCPG) ou encore certaines cytokines (Cho et al., 2005 ; Das et al., 2005 ; Eliopoulos et al., 2003).

Les MAP kinases ERK sont connues pour jouer un rôle dans l'hypoxie, et à ce jour aucune étude ne suggère la participation de Tpl2 dans l'activation de ces kinases dans ce phénomène.

Nos résultats indiquent qu'*in vitro* Tpl2 participe à l'activation des kinases ERK lors d'une stimulation par l'hypoxie, dans les adipocytes mais également dans les macrophages. Et que l'inhibition de Tpl2 diminue l'état inflammatoire induit par l'hypoxie ce qui est caractérisée par une diminution de l'expression de certaines cytokines inflammatoires et une diminution de la lipolyse. L'étude du facteur de transcription HIF indique que l'inhibition de Tpl2 altère la stabilisation de la sous-unité α lors de l'hypoxie, ce qui pourrait également expliquer les effets observés.

Matériels et méthodes

Culture cellulaire

Les cellules sont cultivées dans du DMEM contenant du SVF décomplémenté soit en normoxie à 37°C, 5% CO₂ et 95% air atmosphérique soit en hypoxie à 37°C, 5% CO₂ et 1% O₂. Les macrophages Raw Blue expriment la phosphatase alcaline sous un promoteur contrôlé par les facteurs de transcription NF-κB et AP-1. Lors de l'activation de ces facteurs de transcription la phosphatase est sécrétée dans le milieu de culture, et son dosage reflète l'activation de NF-κB et/ou AP-1.

Préparation des macrophages dérivés de la moelle osseuse

La moelle osseuse est isolée à partir du tibia et du fémur de souris male C57BL/6J (Charles River Laboratoires) comme décrit (Nguyen et al., 2007). Les souris sont tuées par dislocation cervicale, et les cellules de la moelle osseuse sont resuspendues dans du DMEM contenant 30% de milieu conditionné de L-929 (contenant le facteur de différenciation MCSF), 20% SVF décomplémenté et des antibiotiques. Les cellules sont différenciées et prêtes à être utilisées après 7 jours.

Milieux conditionnés d'adipocytes et de macrophages

Les adipocytes 3T3-L1 (5×10^6 , en pétri) ou les macrophages (5×10^6 en pétri) sont cultivés dans du DMEM 5% SVF en condition d'hypoxie pendant 24h. Les milieux conditionnés sont ensuite placés sur des adipocytes en normoxie pendant 24h.

Explants de tissu adipeux

Les panicules adipeux épидидymaires des souris males sont récupérés, découpés en petits morceaux puis placés dans du DMEM 5% SVF décomplémenté. Pour chaque souris un panicule est placée en condition de normoxie et l'autre panicule est placée en condition d'hypoxie pendant 20 heures.

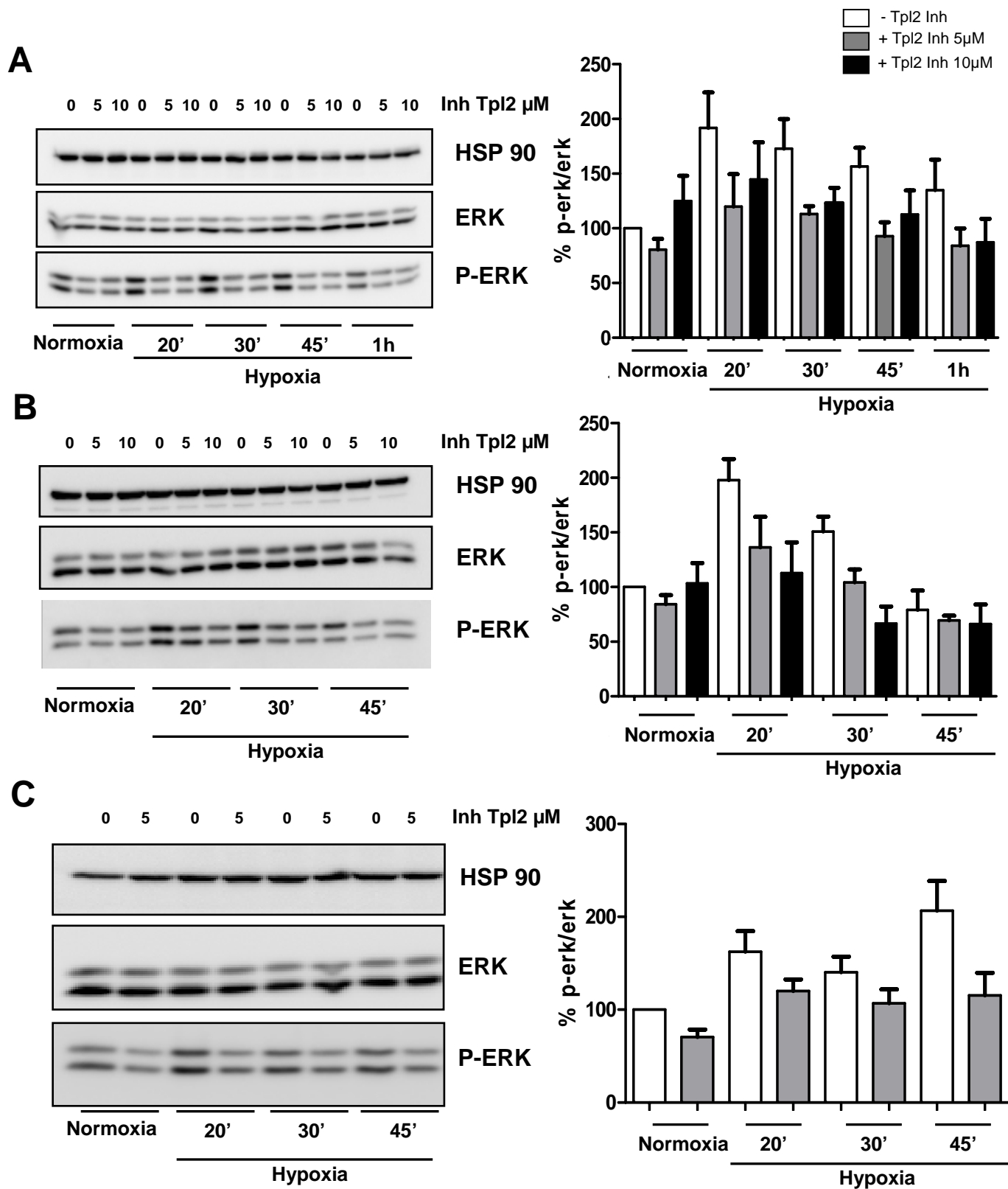


Figure 1 : Implication de Tpl2 dans l'activation des MAP kinases ERK induite par l'hypoxie

Phosphorylation des MAP kinases ERK 1/2 en réponse à l'hypoxie dans les macrophages Raw (A), les macrophages J774 (B) et les adipocytes (C).

Analyse statistique

L'analyse statistique est réalisée par le logiciel GraphPad PRISM 5. Les différences entre les groupes sont analysées par un test ANOVA suivi d'un test post hoc. $P < 0.05$ est considéré comme statistiquement différent.

Résultats

Implication de Tpl2 dans l'activation des MAP kinases ERK lors d'une stimulation par l'hypoxie

On observe la phosphorylation des MAP kinases ERK 1/2 dans les lignées de macrophages Raw 264.7 et J774 lorsque ceux-ci sont placés dans des conditions d'hypoxie à 1% O₂ (Figure 1a et b). L'inhibition pharmacologique de Tpl2 dans ces lignées cellulaires induit une diminution de la phosphorylation de ces kinases aux différents temps d'hypoxie, sans altération de l'activation basale observée en normoxie. Dans les adipocytes, l'hypoxie induit également la phosphorylation des kinases ERK 1/2 au travers de l'activation de Tpl2 (Figure 1c).

L'inflammation induite par l'hypoxie est partiellement dépendante de l'activation de Tpl2.

Les macrophages Raw Blue placés en condition d'hypoxie durant 24 heures présentent une activation de voies de signalisation inflammatoires, plus précisément une activation des facteurs de transcription NF- κ B et/ou AP-1. En effet, les macrophages Raw Blue sont capables de produire la phosphatase alcaline lors de l'activation des facteurs NF- κ B ou AP-1. Ainsi on observe une augmentation de la production de la phosphatase alcaline en hypoxie, et cette production est abolie lorsque Tpl2 est inhibé pharmacologiquement (Figure 2a). L'état inflammatoire induit par l'hypoxie est retrouvé sur l'expression des cytokines inflammatoires IL-1 β et PAI-1 dans deux lignées de macrophages (les Raw 264.7 et les J774). Cet état inflammatoire s'accompagne d'une orientation de ces macrophages vers un profil pro-inflammatoire (M1) comme l'indique l'augmentation du marqueur CD11c. De manière intéressante l'inhibition de Tpl2 dans les conditions d'hypoxie permet de diminuer drastiquement l'augmentation d'expression des cytokines IL-1 β et PAI-1 et du marqueur inflammatoire CD11c (Figure 2b et c). L'hypoxie induit également un état inflammatoire au niveau des adipocytes en induisant la lipolyse et également l'augmentation d'expression des

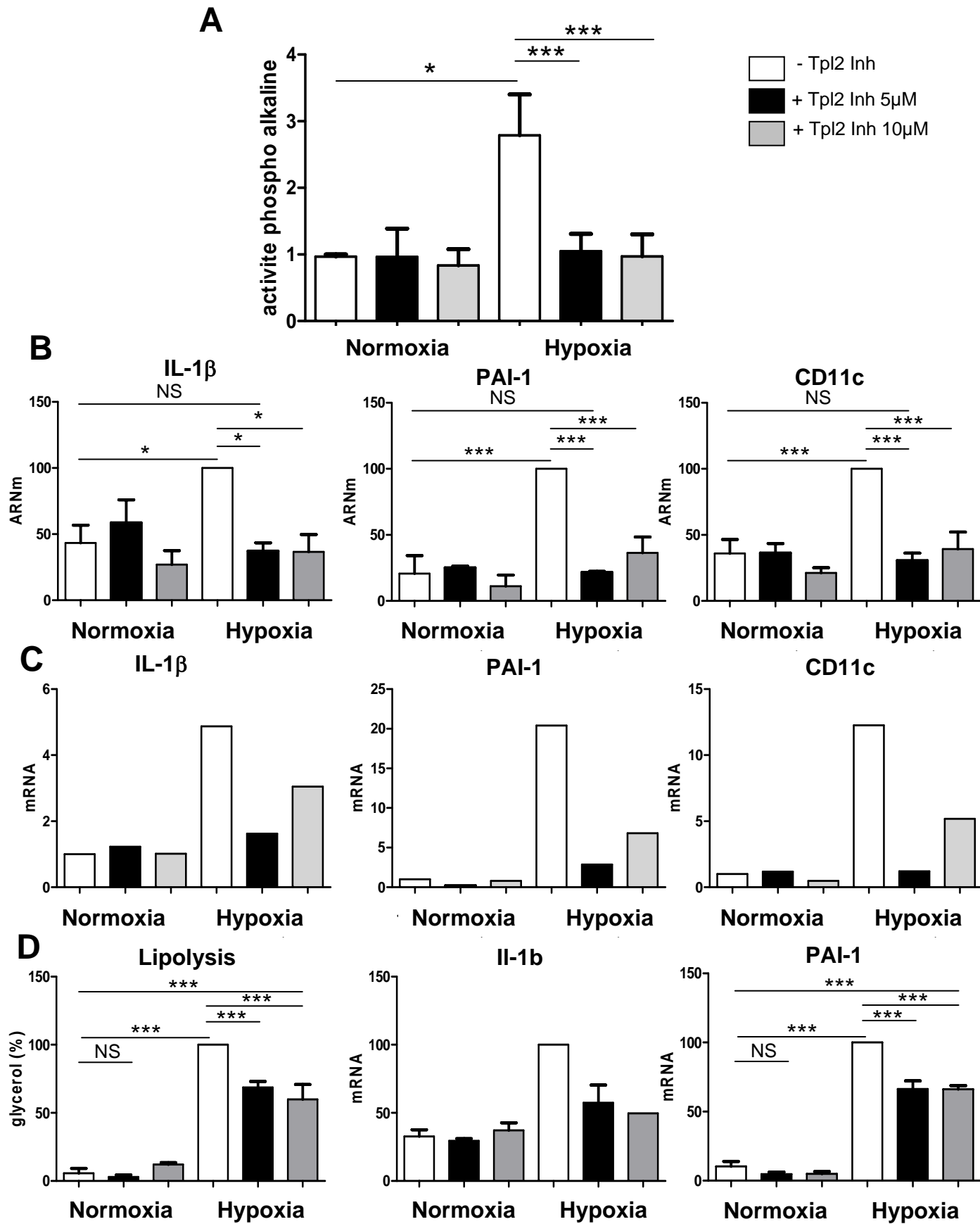


Figure 2 : Tpl2 participe à l'effet inflammatoire de l'hypoxie sur les macrophages et les adipocytes

Les macrophages Raw Blue, Raw ou J774 et les adipocytes sont incubés ou non en hypoxie durant 24h. (A) Production de la phosphatase alcaline par les macrophages Raw Blue. Expression de cytokines et marqueur inflammatoires dans les macrophages Raw (B) ou les macrophages J774 (C). (D) Lipolyse et expressions de cytokines dans les adipocytes.

cytokines inflammatoires précédemment évoquées. L'inhibition de Tpl2 dans les adipocytes permet de diminuer la lipolyse et l'expression des cytokines inflammatoires avec cependant un effet moins important que celui observé dans les macrophages (Figure 2d). Les macrophages dérivés de la moelle osseuse en profil anti-inflammatoire (M2) présentent une augmentation de l'expression de l'IL-1 β mais aucune variation de celle du PAI-1 et une tendance à la baisse pour le marqueur CD11c. L'inhibition pharmacologique de Tpl2 ou l'étude de macrophages M2 dérivés de la moelle de souris invalidées pour Tpl2 permet de diminuer de l'expression de l'IL-1 β et aucun impact sur les expressions du PAI-1 et du CD11c (Figure 3a). De manière intéressante, lorsque ces macrophages M2 sont pré-stimulés avec du LPS afin de les activer et les orienter vers un profil pro-inflammatoire (M1), on observe une augmentation des expressions de l'IL-1 β , du PAI-1 et du CD11c dans les conditions d'hypoxie. L'inhibition de Tpl2 soit pharmacologiquement, soit génétiquement permet de réduire fortement l'expression de ces cytokines et du marqueur CD11c (Figure 3b). Ces effets sur l'expression des cytokines sont retrouvés lorsque des macrophages dérivés de la moelle osseuse vers un profil pro-inflammatoire (M1) sont placés en hypoxie. A l'inverse aucune augmentation d'expression du marqueur CD11c n'est observée en condition d'hypoxie, ce qui peut s'expliquer par le fait que les macrophages se trouvent déjà dans un profil pro-inflammatoire et expriment donc des niveaux de CD11c importants (Figure 3c). Ces résultats suggèrent donc que Tpl2 intervient dans la régulation d'expression de médiateurs de l'inflammation lors de l'hypoxie à la fois dans les macrophages et dans les adipocytes.

L'invalidation de Tpl2 dans le tissu adipeux abolit la réponse à l'hypoxie

Lorsque des explants de tissu adipeux de souris sauvages sont placés en condition d'hypoxie on observe une augmentation significative de l'expression de nombreuses adipokines telles que le TNF α , l'IL-1 β , le PAI-1, l'IL-12 et le TGF β , l'apeline ainsi que le facteur VEGF α . A l'inverse les explants de tissu adipeux provenant de souris invalidées pour Tpl2 ne démontrent aucune modification d'expressions et ont des expressions équivalentes entre la condition de normoxie et la condition. Il est intéressant de souligner que les niveaux d'expressions des différentes adipokines en normoxie sont identiques entre les souris sauvages et les souris invalidées pour Tpl2 (Figure 4).

Ces résultats démontrent que dans un modèle *ex vivo*, Tpl2 est un acteur prépondérant dans la réponse inflammatoire induite par l'hypoxie au niveau du tissu adipeux.

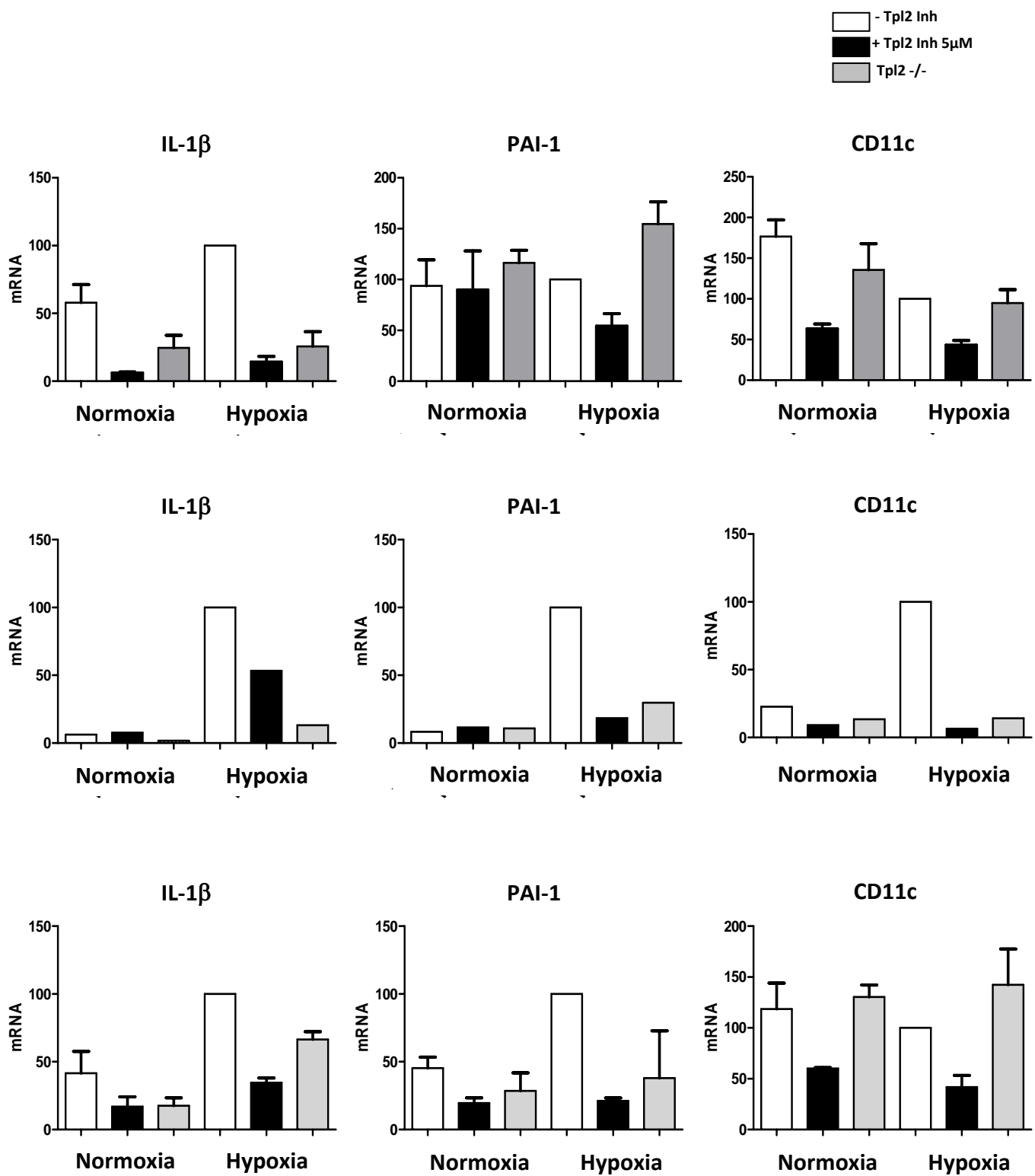


Figure 3 : Implication de Tpl2 dans l'inflammation des macrophages pro-inflammatoires induites par l'hypoxie

Expressions des cytokines et marqueurs inflammatoire dans les macrophages BMDM issus de souris sauvages (WT) ou de souris invalidées pour Tpl2 (Tpl2^{-/-}) différenciés en type M2 (A), en type M2 pré-stimulés avec du LPS (B) ou en type M1 (C) sont incubés ou non en hypoxie durant 24h.

Tpl2 est impliqué dans la production par les adipocytes de facteurs chimio-attractants vis-à-vis des macrophages.

Au sein du tissu adipeux, les adipocytes en hypoxie produisent de nombreux médiateurs inflammatoires dont certaines chimiokines. Ces chimiokines vont avoir pour effets d'attirer des macrophages au sein de la zone hypoxique et ainsi aboutir à une aggravation de l'inflammation locale. Nos résultats précédents indiquent que Tpl2 participe à la régulation d'expression de certaines adipokines en condition d'hypoxie. Lorsque que l'on place des macrophages Raw en présence d'un milieu conditionné d'adipocytes hypoxiques on observe une augmentation de leur capacité migratoire. Un milieu conditionné d'adipocytes dans lesquels Tpl2 est inhibé, soit pharmacologiquement soit par l'utilisation d'ARN interférents, n'est plus capable d'induire la migration des macrophages (Figure 5a). Associé aux effets sur la migration, le milieu conditionné d'adipocytes hypoxiques induit l'augmentation de l'expression de certaines cytokines telles que le $\text{TNF}\alpha$, l' $\text{IL-1}\beta$ et le PAI-1 mais également celle de marqueurs de macrophages pro-inflammatoires qui sont le CD11c et INOS. Lorsque Tpl2 est inhibé dans les adipocytes, le milieu conditionné n'induit plus d'augmentation d'expression de ces cytokines et de ces marqueurs inflammatoires par les macrophages (Figure 5b). Ces résultats indiquent que la production de médiateurs par les adipocytes hypoxiques induit l'attraction et l'activation des macrophages, et que la production de ces médiateurs est dépendante de Tpl2.

L'inhibition de Tpl2 empêche la stabilisation de HIF-1 α induite par l'hypoxie

Lors de l'hypoxie la sous-unité α du HIF-1 est stabilisée, permettant ainsi son association avec la sous-unité β et donc l'activation du facteur de transcription HIF-1. Comme attendu dès 30 minutes d'hypoxie on observe une stabilisation de HIF-1 α dans les deux lignées de macrophages, que ce soit Raw ou les J774 (Figure 6a et b). A l'inverse lorsque Tpl2 est inhibé la stabilisation de HIF-1 α induite par l'hypoxie est bloquée ou fortement diminuée, dans les différentes lignées cellulaires. Ces résultats suggèrent que les effets observés sur l'inflammation lors de l'inhibition de Tpl2 pourraient en partie provenir de l'altération de la stabilisation de HIF-1 α .

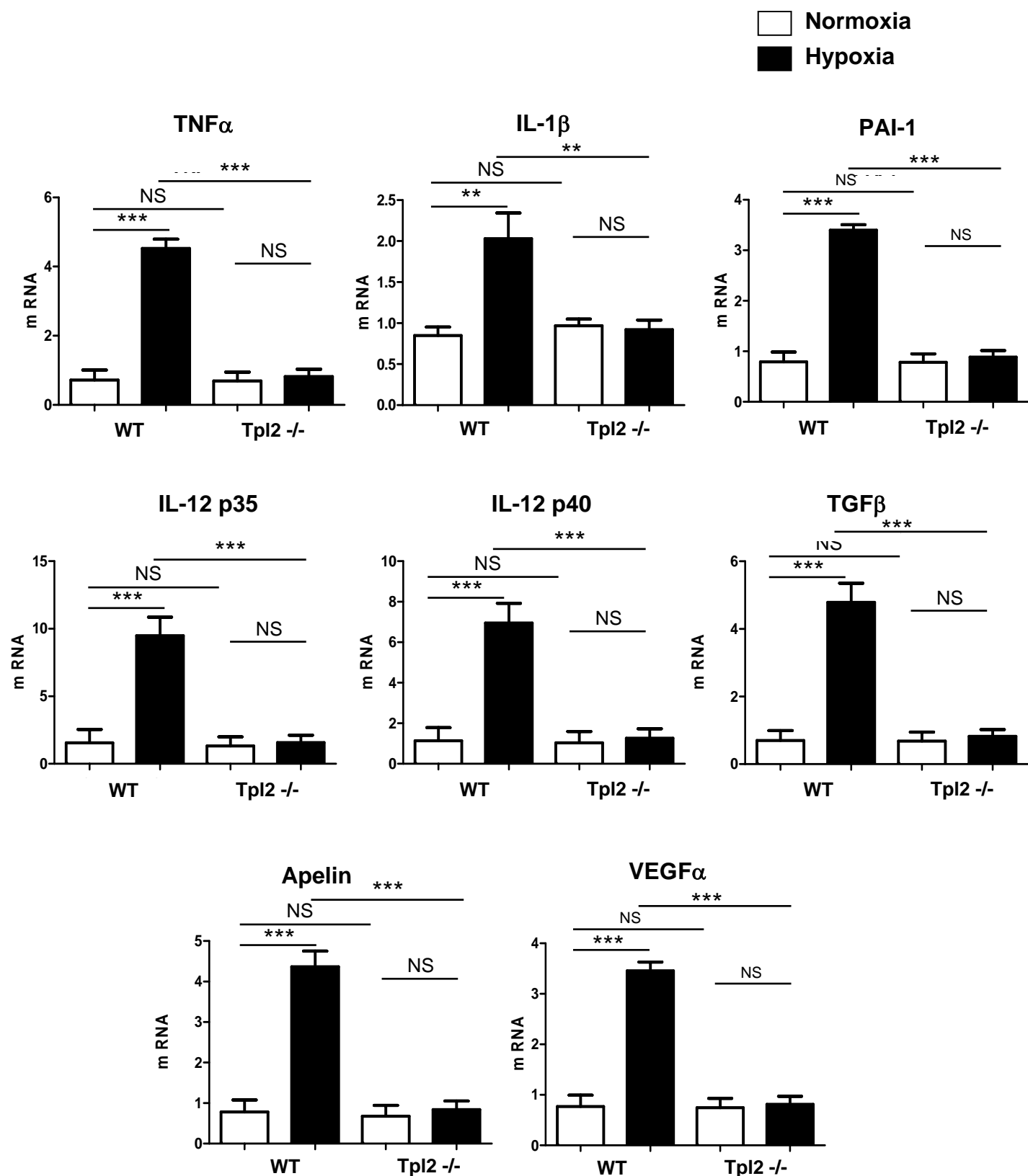


Figure 4: Les Explants de tissu adipeux de souris déplétées pour Tpl2 ne sont pas sensibles à l'hypoxie
 Expressions des ARNm de nombreuses adipokines dans des explants de tissu adipeux de souris sauvages (WT) ou de souris invalidées pour Tpl2 (Tpl2^{-/-}) incubés en normoxie (histo blanc) ou en hypoxie (histo noir) durant 24h.

La production de facteurs inflammatoires par les macrophages et les adipocytes hypoxiques induit une insulino-résistance des adipocytes.

Les zones hypoxiques sont associées au développement d'une inflammation locale, les facteurs inflammatoires produits provenant des adipocytes et des macrophages. Ces médiateurs de l'inflammation vont alors diffuser aux zones normoxiques situées en périphérie de la zone hypoxique, et ainsi altérer les fonctions métaboliques des cellules. Nos résultats indiquent qu'un milieu conditionné d'adipocytes hypoxiques est capable d'induire une augmentation de la lipolyse et une diminution de la signalisation de l'insuline dans des adipocytes situés en normoxie. La diminution de la signalisation de l'insuline s'observe à différentes concentrations de l'hormone et se traduit par une diminution de la phosphorylation de la PKB sur la serine 473 induite par l'insuline, cependant nous n'observons pas de modification des niveaux protéiques de la protéine IRS-1 (Figure 7a). Les milieux conditionnés de macrophages placés en hypoxie induisent également la lipolyse des adipocytes et la diminution de la signalisation de l'insuline aux différentes concentrations utilisées, avec une diminution de la phosphorylation de la PKB et aucune modification d'IRS-1 (Figure 7b et c). L'inhibition de Tpl2 dans les adipocytes hypoxiques n'est pas capable de réduire la lipolyse induite par leur milieu conditionné. A l'inverse lorsque Tpl2 est inhibé dans les macrophages hypoxiques la lipolyse induite par leurs milieux conditionnés est significativement diminuée. De manière inattendue l'inhibition de Tpl2 dans les adipocytes et dans les macrophages hypoxiques n'est pas capable de restaurer la signalisation insulinaire même avec l'utilisation de fortes concentrations (100nM) (Figure 6a, b, c). Ces résultats indiquent que malgré une diminution de la lipolyse induite, l'inhibition de Tpl2 dans les macrophages n'est pas suffisante pour empêcher l'altération de la signalisation de l'insuline dans les adipocytes.

Conclusion

Le développement de zone hypoxique dans le tissu adipeux, notamment lors de l'obésité, est associé à la mise en place d'un état inflammatoire au niveau local. Cette inflammation se traduit par une augmentation de la production de facteurs inflammatoires par les adipocytes et les cellules immunitaires tels que les macrophages, ainsi qu'une augmentation de libération d'acides gras spécifiquement par les adipocytes. Ces médiateurs de l'inflammation vont alors agir localement ainsi qu'en périphérie induisant ainsi des dysfonctions

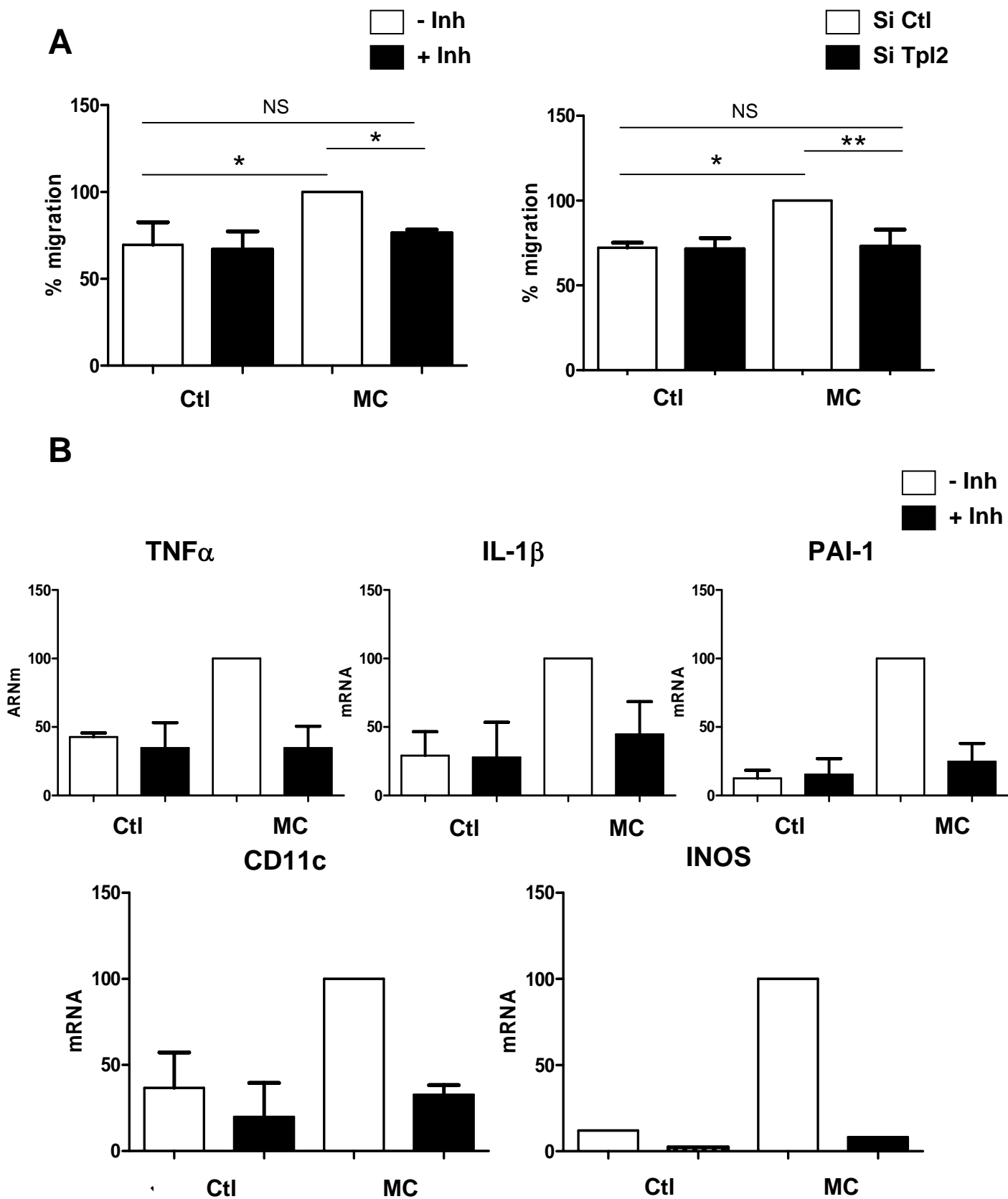


Figure 5 : L'inhibition de Tpl2 diminue l'effet chimio-attractant et inflammatoire des adipocytes en hypoxie

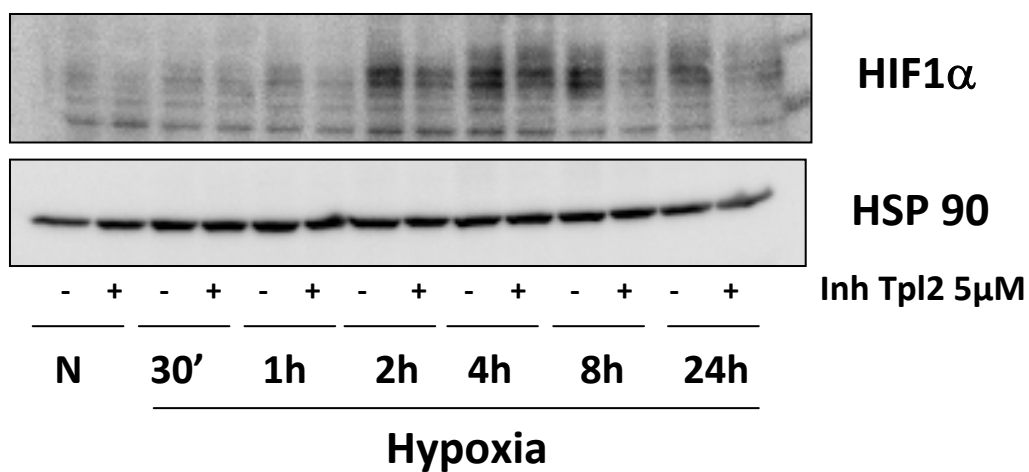
(A) Migration des macrophages Raw induite par les milieux conditionnés d'adipocytes en normoxie ou en hypoxie. (B) Expression de différentes cytokines et marqueurs inflammatoires dans les macrophages Raw stimulés avec les milieux conditionnés d'adipocytes.

métaboliques et un maintien de l'inflammation. Nos résultats indiquent que la MAP3 kinase inflammatoire Tpl2 participe à l'activation des kinases ERK 1/2 induite par l'hypoxie à la fois dans les adipocytes et dans les macrophages. L'hypoxie induit une augmentation de la lipolyse et de l'expression de certaines cytokines telles que l'IL-1 β et le PAI-1 dans les adipocytes au travers de l'activation de Tpl2. De même l'inhibition de Tpl2 dans les adipocytes permet de diminuer leur production de facteurs chimio-attractants vis-à-vis des macrophages, et donc potentiellement réduire le recrutement des macrophages au sein du site hypoxique.

Dans les macrophages Tpl2 participe également à la régulation de l'expression des cytokines IL-1 β et PAI-1 mais aussi à la polarisation des macrophages vers un profil pro-inflammatoire M1 comme l'indique l'expression du marqueur CD11c. L'hypoxie active les facteurs de transcription NF- κ B et/ou AP-1 dans les macrophages, et cette activation semble totalement dépendante de Tpl2. Cependant, il est intéressant de noter que les macrophages orientés vers un profil anti-inflammatoire sont beaucoup moins activés par l'hypoxie que les macrophages pro-inflammatoires. Mais que ce soit avec les macrophages M2 ou M1 Tpl2 est impliqué dans leur activation.

L'étude du tissu adipeux global démontre que l'invalidation de Tpl2 abolit totalement les effets de l'hypoxie, et place donc cette kinase comme un acteur prépondérant dans la réponse à l'hypoxie au sein de ce tissu. Ces effets pourraient provenir de la régulation de la stabilisation de la sous-unité α de HIF-1, empêchant ainsi son activation et la régulation des gènes qu'il contrôle.

A



B

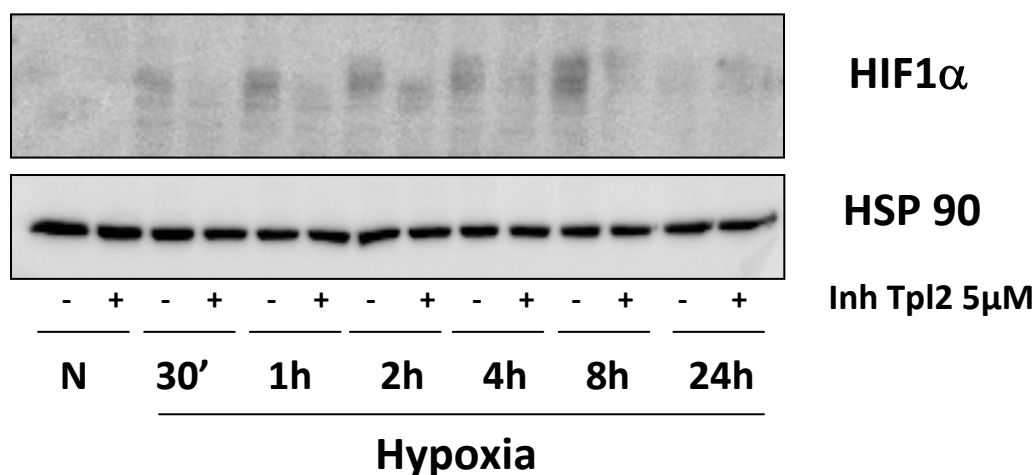


Figure 6 : L'inhibition de Tpl2 altère la stabilisation de HIF1 α en hypoxie

Niveaux protéiques de HIF-1 α au cours d'une cinétique d'incubation des macrophages Raw (A) ou J774 (B) en hypoxie en absence et en présence d'un inhibiteur de Tpl2.

□ - Inh
 ■ + Inh

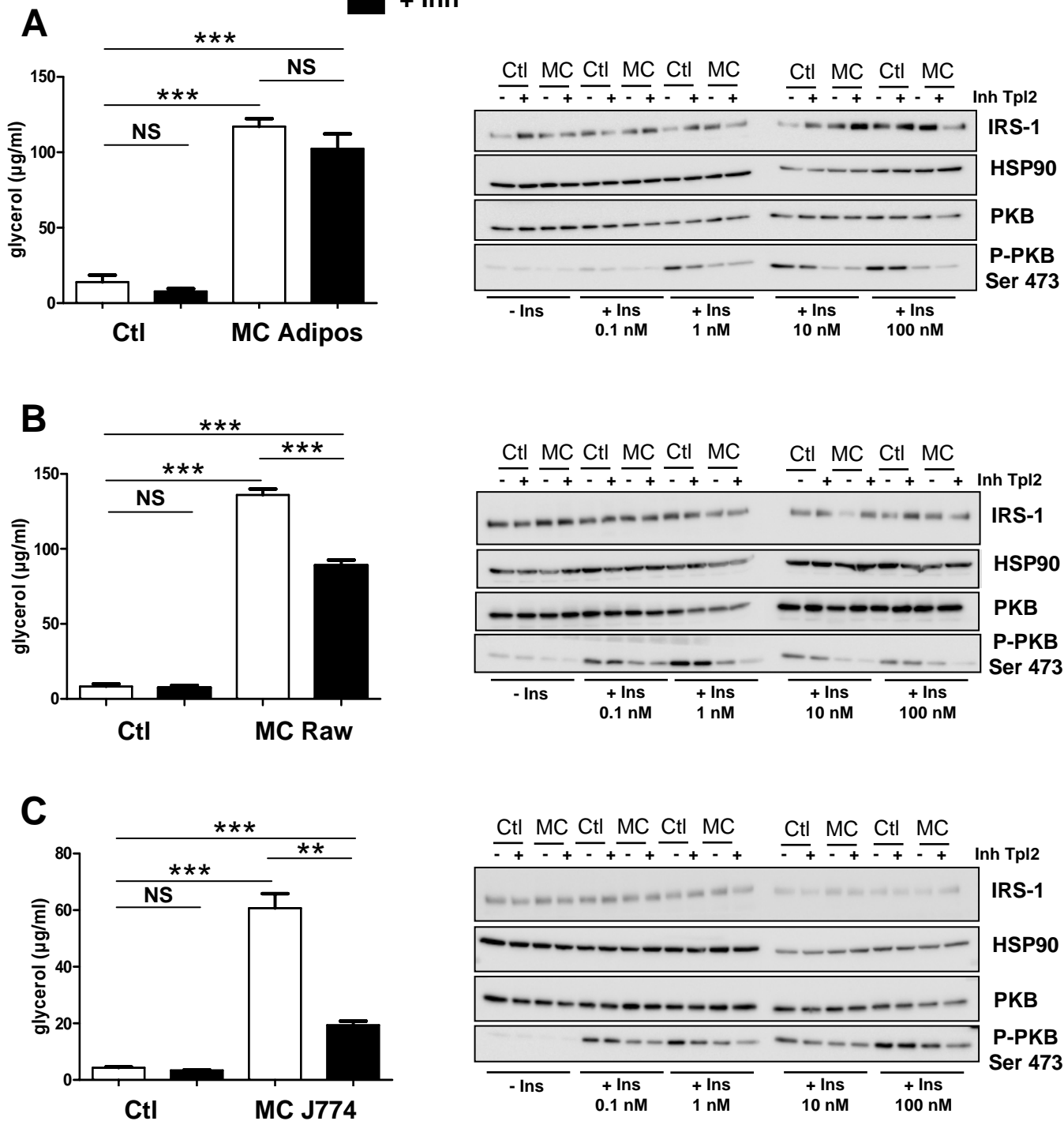


Figure 7 : Des milieux conditionnés d'adipocytes ou de macrophages perturbent le métabolisme des adipocytes

Des adipocytes en normoxie sont incubés avec des milieux conditionnés d'adipocytes (A), de macrophages Raw (B) ou de macrophages J774 (C) placés en hypoxie durant 24h en absence ou en présence de l'inhibiteur de Tpl2. La lipolyse induite par les milieux conditionnés ainsi que la réponse à l'insuline des adipocytes sont étudiées.

Discussion, conclusion et perspectives

L'obésité est une pathologie dont la prévalence ne cesse de croître à travers le monde. Les nombreuses complications liées à l'obésité font de cette maladie un véritable problème de santé publique. Une des principales complications de l'obésité est la résistance à l'insuline qui favorise l'émergence du diabète de type 2. De nombreuses études ont été menées dans le but de déterminer le lien entre l'obésité et de l'insulino-résistance. A l'heure actuelle, il est clairement établi que l'obésité est associée à un état inflammatoire chronique de bas grade au niveau systémique, et que le tissu adipeux, lui-même enflammé, participe activement dans ce phénomène par la production de cytokines pro-inflammatoires. De nombreuses études s'accordent à montrer que l'inflammation du tissu adipeux durant l'obésité contribue à la mise en place de l'insulino-résistance, et du diabète de type 2 (Exley et al., 2014 ; Gregor and Hotamisligil, 2011 ; Lee and Lee, 2014). Durant l'obésité, les populations de cellules immunitaires du tissu adipeux sont modifiées avec une augmentation de cellules pro-inflammatoires en particulier les macrophages (Exley et al., 2014 ; McNelis and Olefsky, 2014). Il s'installe alors dans ce tissu des dialogues entre les adipocytes hypertrophiés et les cellules de l'immunité ce qui aboutit à une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires et à la libération d'acides gras (Suganami et al., 2005). Ces facteurs vont avoir des effets délétères sur la signalisation de l'insuline au niveau local mais également au niveau systémique (Exley et al., 2014 ; Gregor and Hotamisligil, 2011 ; Lee and Lee, 2014). En effet, les cytokines $TNF\alpha$, l'IL-6, l'IL-1 β et le CD40L sont retrouvées augmentées dans la circulation sanguine et dans le tissu adipeux d'individus obèses et ont clairement été impliquées dans la résistance à l'insuline (Gregor and Hotamisligil, 2011; Jager et al., 2007 ; Poggi et al., 2009 ; Rotter et al., 2003). Les acides gras libérés par l'adipocyte altèrent la signalisation insulinique, la sensibilité à l'insuline et le métabolisme en agissant dans les muscles squelettiques, le foie et le pancréas (Cusi, 2010 ; Delarue and Magnan, 2007). Les acides gras libérés agissent également localement dans le tissu adipeux, et participent à l'altération de la signalisation de l'insuline dans les adipocytes, ils participent également à l'activation de la réponse inflammatoire dans les macrophages présents dans le tissu (Kennedy et al., 2009; Shi et al., 2006b). L'inflammation du tissu adipeux lors de l'obésité étant un élément important dans le développement de l'insulino-résistance, sa régulation pourrait permettre une amélioration de la sensibilité à l'insuline et des dysfonctions métaboliques qui lui sont associée. L'identification de mécanismes moléculaires ainsi que de protéines spécifiquement impliquées dans ce processus pourrait

donc permettre l'identification de potentielles cibles thérapeutiques dans la lutte contre le diabète de type 2.

Les MAP kinases ERK ont été décrites pour être impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires en rapport avec l'inflammation et l'insulino-résistance tels que la production de cytokines inflammatoires par les macrophages, la lipolyse induite par les cytokines, et l'altération de la signalisation de l'insuline au travers de sérine phosphorylations de la protéine IRS-1 (Tanti et al., 2013 ; Tanti and Jager, 2009). De manière intéressante l'activation de la voie de signalisation des MAP kinases ERK est augmentée dans les différents tissus de souris ou patients atteints de diabète de type 2 et/ou obèses (Bashan et al., 2007 ; Bouzakri et al., 2006 ; Lee and Lee, 2014)

Ainsi, nous avons voulu identifier des protéines situées en amont des kinases ERK et spécifiquement activées par des stimuli inflammatoires. L'intérêt s'est ainsi porté sur la MAP3K Tpl2 car elle est spécifiquement activée par les cytokines et les LPS (Gantke et al., 2011; Gantke et al., 2012) ; facteurs inflammatoires dont les taux circulants sont retrouvés augmentés chez les individus obèses. Nous avons montré que l'expression de Tpl2 est augmentée dans le tissu adipeux de souris et individus obèses et que cette augmentation est retrouvée dans les adipocytes mais également dans les macrophages pro-inflammatoires présent dans le tissu adipeux de souris obèses. De plus, ses niveaux d'expression dans le tissu adipeux sont positivement corrélée avec un marqueur inflammatoire le TNF α (Jager et al., 2010). Dans les adipocytes, nous avons montré que Tpl2 participe à l'augmentation de lipolyse induite par les cytokines inflammatoires (Jager et al., 2010).

Tpl2 au sein des macrophages joue un rôle important dans le dialogue entre adipocytes et macrophages et l'insulino-résistance des adipocytes

Comme mentionné précédemment, une boucle paracrine inflammatoire entre adipocytes et macrophages impliquant acides gras et cytokines inflammatoires, pourrait participer au maintien de l'inflammation du tissu adipeux (Suganami et al., 2007a; Suganami et al., 2005). En utilisant un système de co-culture entre adipocytes et macrophages, nous avons montré que Tpl2 est impliqué dans ce « dialogue » entre les adipocytes et les macrophages en participant à l'augmentation de l'expression et de la production de cytokines inflammatoires et à la libération d'acides gras (**Article 1**). En utilisant une approche siARN ciblant Tpl2 soit dans les macrophages soit dans les adipocytes de la co-culture, nous avons montré que Tpl2

au sein des macrophages était principalement requise pour la production de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β ou le TNF- α dans la co-culture. A l'inverse, l'impact de l'inhibition de Tpl2 dans les adipocytes sur la production de ces cytokines est modeste. L'inhibition de Tpl2 au sein des macrophages en co-culture induit à la fois une diminution d'expression et de production de l'IL-1 β tandis que la diminution de production de TNF α est observée sans modification d'expression de son ARNm suggérant un rôle de Tpl2 dans sa modification post-transcriptionnel. La sécrétion du TNF α est dépendante de sa modification par l'enzyme de conversion TACE, un processus positivement contrôlé par la voie Tpl2/ERK (Dumitru et al., 2000; Rousseau et al., 2008 ; Soond et al., 2005). Il est probable que dans nos conditions de co-culture Tpl2 contrôle la production de TNF α par ce mécanisme. Ces modifications d'expression de cytokines inflammatoires pourraient résulter de modification de l'état de polarisation des macrophages. En effet, la co-culture induit également une polarisation des macrophages en type M1 pro-inflammatoire, ce qui est indiqué par l'augmentation d'expression de marqueurs pro-inflammatoires (CD11c, INOS et CD127) et une diminution d'expression de marqueurs anti-inflammatoires (Arg1 et CD163). De manière intéressante l'inhibition de Tpl2 prévient partiellement l'induction de l'expression des marqueurs M1 sans avoir d'impact sur l'expression des marqueurs M2 suggérant que Tpl2 pourrait contrôler la polarisation des macrophages.

Les acides gras non estérifiés sont d'important médiateurs inflammatoires dans le tissu adipeux et sont impliqués dans les effets de la co-culture (Nguyen et al., 2007b; Shi et al., 2006b ; Suganami et al., 2005; Suganami et al., 2007b). Nous avons observés que l'inhibition pharmacologique de Tpl2 réduit la lipolyse induite par la co-culture et que Tpl2 dans les deux types cellulaires contribuent à l'augmentation de la lipolyse dans ces conditions puisque l'invalidation de Tpl2 spécifiquement dans les macrophages en co-culture ou spécifiquement dans les adipocytes en co-culture permet de la réduire.

Le modèle que nous proposons est que l'activation de Tpl2 dans les macrophages va conduire à augmenter la production de cytokines inflammatoires par ces cellules et qu'en retour ces cytokines inflammatoires vont activer Tpl2 dans les adipocytes augmentant ainsi la lipolyse. Les acides gras libérés contribueraient, au moins en partie, à l'augmentation de production de cytokines par les macrophages.

Nos résultats présentés dans l'article 2 indiquent que Tpl2 au sein des adipocytes pourrait non seulement être impliquée dans la production d'acide gras pro-inflammatoires, mais

également dans la production de médiateurs lipidique pro-inflammatoire, les prostaglandines E_2 (PGE_2) (Ricciotti and FitzGerald, 2010). Les PGE_2 sont synthétisées par différentes réactions dont le point de départ est la conversion de l'acide arachidonique en PGH_2 par la cyclooxygenase COX-2 (Ricciotti and FitzGerald, 2010). L'enzyme COX-2 et les PGE_2 participe à la modulation de l'inflammation du tissu adipeux (González-Périz and Claria, 2010). Nous montrons que Tpl2 dans les adipocytes est impliquée dans l'augmentation d'expression de COX-2 et la production de PGE_2 induite par les cytokines inflammatoires ou par le « dialogue » entre adipocytes et macrophages. Le rôle de Tpl2 dans la régulation de l'expression de COX-2 dans le tissu adipeux est confirmé par la diminution d'expression de cette enzyme dans les explants de tissu adipeux provenant de souris $Tpl2^{-/-}$ stimulés avec du LPS par rapport aux explants de souris sauvages. Les PGE_2 produites suite à l'activation de la voie de signalisation Tpl2-COX-2 ont des effets pro-inflammatoires sur les macrophages et pourraient donc participer également à l'établissement d'une boucle paracrine pro-inflammatoire entre adipocytes et macrophages.

Un autre facteur important intervenant dans l'inflammation et l'insulino-résistance du tissu adipeux est les LPS provenant de la flore intestinale (Cani et al., 2007 ; Cani et al., 2012). Les cytokines, les acides gras libres et les LPS sont décrits pour altérer la signalisation de l'insuline, et dans ce sens nous observons une diminution de la signalisation insulinique dans les adipocytes en co-culture ou incubés avec un milieu conditionné de macrophages stimulés avec du LPS. Cette altération passe par la diminution des niveaux protéiques de la protéine IRS-1 et une diminution de la phosphorylation de la protéine PKB sur la Ser⁴⁷³. L'inhibition pharmacologique de Tpl2 restaure partiellement la signalisation de l'insuline avec une restauration partielle des niveaux protéiques d'IRS-1 et de la phosphorylation de PKB. L'inhibition pharmacologique de Tpl2 est associée également à une diminution de deux mécanismes important dans les altérations de la signalisation insulinique : la serine phosphorylation d'IRS-1 et l'expression des protéines SOCS3 (Boura-Halfon and Zick, 2009; Gual et al., 2005 ; Tanti and Jager, 2009).

Nos résultats suggèrent que le ciblage de Tpl2 dans les macrophages là encore est primordial pour les effets observés. Ceci indique que les effets que nous observons sur l'amélioration de la signalisation insulinique adipocytaire sont essentiellement dus à une réduction de la

production de médiateurs inflammatoires consécutive à l'inhibition de Tpl2 dans les macrophages.

L'ensemble de nos résultats suggère donc que le ciblage de Tpl2 au sein des macrophages ou potentiellement d'autres cellules immunitaires infiltrant le tissu adipeux pourrait avoir des effets bénéfiques sur l'inflammation de ce tissu et l'insulinorésistance.

La voie de signalisation contrôlée Tpl2 dans les adipocytes régule la production de chimiokines

Un paramètre important dans le développement et le maintien de l'inflammation du tissu adipeux est l'infiltration de cellules immunitaires telles que les macrophages. De nombreuses études mettent en avant la participation de certaines chimiokines ou facteurs chimio-attractants dans ce mécanisme et suggèrent qu'il s'agit d'un processus complexe faisant intervenir un grand nombre d'acteurs.

Nos résultats indiquent que les adipocytes placés en conditions inflammatoires sont capable de produire des facteurs chimio-attractants et que l'inhibition de Tpl2 permet de diminuer cette production et donc la migration des macrophages. Il est intéressant de noter que le LPS est par lui-même capable d'attirer les macrophages et cette migration n'est pas clairement modifiée lorsqu'on inhibe Tpl2 directement dans les macrophages. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la migration est bien la résultante de la diminution de la production de facteurs chimio-attractants par les adipocytes et non par une régulation directe des capacités migratoire des macrophages. Ces résultats ne sont pas en accord avec une étude *in vivo* récente qui implique Tpl2 dans la migration des macrophages dans la cavité péritonéale induite par le thioglycollate, notamment en régulant l'expression de certains récepteurs aux chimiokines (Rowley et al., 2014). Cette étude implique Tpl2 dans la régulation des récepteurs CCR1 et CCR5 dans les macrophages issus de souris invalidées pour Tpl2. En condition de co-culture nous retrouvons également l'induction d'expression du récepteur CCR1 dans les macrophages et l'inhibition pharmacologique de Tpl2 dans la co-culture ou spécifiquement dans les adipocytes par l'utilisation d'ARN interférents permet de diminuer son expression. Il serait donc intéressant de comparer dans nos conditions, les capacités migratoires de macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris invalidées pour Tpl2 par rapport aux macrophages provenant de souris sauvages et plus particulièrement dans la migration induite par le LPS.

Nous mettons également en avant la diminution des capacités migratoires des macrophages M1 par rapport aux macrophages M2. Ceci pourrait s'expliquer par l'expression d'une protéine, la Nétrine 1 dont l'expression est augmentée dans les macrophages stimulés par les acides gras et potentiellement par le LPS. Ainsi les macrophages pro-inflammatoires situés dans le tissu adipeux de souris obèses ont une capacité migratoire réduite qui est restaurée lors de l'inhibition de la Nétrine 1 (Ramkhalawon et al., 2014). Il serait donc intéressant d'étudier la modulation d'expression de la Nétrine 1 dans les macrophages M2 et M1 lors de nos différentes conditions. L'étude des expressions des différents facteurs chimio-attractants dans les adipocytes suggère que suivant l'origine de la stimulation les facteurs produits vont être différents. Ceci permet de confirmer qu'il s'agit d'un mécanisme complexe et que la régulation d'un seul facteur n'induit pas nécessairement l'inhibition de l'infiltration des macrophages au sein du tissu adipeux.

Un rôle pour Tpl2 dans la réponse inflammatoire induite par l'hypoxie du tissu adipeux ?

Les différentes MAP kinases peuvent être activées en condition hypoxique dans différents types cellulaires. Par exemple l'hypoxie active les kinases ERK au travers de la voie Ras/Raf-1 dans cellules endothéliales ou les MAP kinases p38 et JNK dans les cardiomyocytes (Lo et al., 2001 ; Seko et al., 1997). Des zones hypoxiques se développent dans le tissu adipeux et pourraient contribuer à l'augmentation de la réponse inflammatoire des macrophages et à l'insulino-résistance des adipocytes (Regazzetti et al., 2009; Trayhurn et al., 2008). Nous avons donc recherché si Tpl2 contribue à l'activation des MAP kinases dans les adipocytes et les macrophages soumis à une hypoxie expérimentale et étudié le rôle potentiel de Tpl2 dans la réponse inflammatoire induite par l'hypoxie.

Nos résultats indiquent que l'inhibition de Tpl2 à la fois dans les adipocytes et les macrophages prévient l'activation de ERK 1/2 en réponse à l'hypoxie indiquant que Tpl2 est activée en hypoxie et contrôle la voie ERK1/2. L'étude de l'activation des MAP kinases JNK et p38 n'apportant pas de résultats reproductibles le rôle de Tpl2 dans l'activation de ces kinases au sein de ces types cellulaires reste à être défini.

Nous avons ensuite recherché si l'absence de Tpl2 dans le tissu adipeux pouvait influencer sur la réponse à l'hypoxie. Nous avons pour cela utilisé une méthode *ex vivo* avec des explants de tissu adipeux epididymaires provenant de souris sauvages ou invalidées pour Tpl2, que nous avons placés soit en hypoxie soit maintenus en normoxie. Nous observons que l'hypoxie

induit une augmentation d'expression de différentes adipocytokines dont l'apeline, le TGF β , le VEGF α , TNF α , IL-1 β , PAI-1, IL-12 dans les explants de souris sauvages. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études *in vitro* montrant que l'hypoxie augmente de l'expression et de la production de ces adipokines dans les adipocytes et la fraction stroma-vasculaire (Kunduzova et al., 2008 ; Ye, 2009 ; Ye et al., 2007). De manière tout à fait intéressante on observe que les explants de souris invalidées pour Tpl2 ne montrent aucune modulation de l'expression de ces adipocytokines lors de l'hypoxie. Ces résultats pourraient être la résultante d'une part de l'action directe de l'inhibition de Tpl2 sur la régulation des gènes de ces adipokines et d'autre part de l'inhibition de la stabilisation de HIF-1 α lorsque Tpl2 est bloqué. La combinaison de ces deux paramètres contribue certainement à l'absence totale de réponse des explants déficients pour Tpl2 entre la normoxie et l'hypoxie. Pour tester *in vivo* les conséquences de l'hypoxie du tissu adipeux, il serait intéressant de ligaturer l'artère spermatique afin d'induire une hypoxie modérée du tissu adipeux epididymaire. Il a été montré que ce protocole induit une oxygénation de 5,3% dans le panicule « hypoxié » par rapport à 7,1% pour le panicule « normoxié » (Suga et al., 2010). Cette approche induit une hypoxie du tissu adipeux avec l'augmentation de HIF-1 α et Glut1, une inflammation avec l'augmentation du TNF α , de l'IL-1 β et de l'IL-6 mais également un recrutement des macrophages avec l'augmentation du marqueur F4/80. Il faut cependant noter qu'une limite de ce protocole expérimental est que le tissu hypoxique est aussi privé partiellement de nutriments, acheminés par le sang.

L'hypoxie pourrait également contribuer au recrutement des macrophages dans le tissu adipeux en augmentant MCP-1. En effet l'immuno-marquage de zones hypoxiques du tissu adipeux met en évidence la présence de cellules immunitaires (Rausch et al., 2008). En accord avec cette hypothèse nos résultats indiquent qu'un milieu conditionné d'adipocytes hypoxiques est capable d'induire la migration des macrophages et que la production de facteurs chimio-attractants est dépendante de Tpl2. Tous ces résultats suggèrent que Tpl2 est un acteur important dans le phénomène d'hypoxie et que son inhibition pourrait permettre de diminuer l'inflammation de la zone hypoxique en réduisant le recrutement des macrophages au sein de cette zone.

Les facteurs produits par l'inflammation développée au sein de la zone hypoxique pourraient diffuser et altérer les fonctions des cellules situées en périphérie. La diminution de l'inflammation observée lors de l'inhibition de Tpl2 pourrait laisser penser que les effets

délétères des zones hypoxiques sur les cellules périphériques devraient être bloqués. Cependant l'inhibition de Tpl2 dans les adipocytes ou les macrophages n'est pas suffisante pour prévenir les altérations de la signalisation insulinaire induites par leurs milieux conditionnés dans les adipocytes normoxiques. Il est intéressant de noter que les sécrétomes de macrophages stimulés avec du LPS ou de macrophages placés en hypoxie ne produisent pas les mêmes effets sur la signalisation insulinaire. En effet lorsque les adipocytes sont incubés avec un milieu conditionné de macrophages stimulés avec du LPS on observe une diminution des niveaux protéiques d'IRS-1 et une diminution de la phosphorylation de la protéine PKB, et l'inhibition de Tpl2 permet de prévenir ces effets. A l'inverse les milieux conditionnés de macrophages hypoxiques induisent une diminution de la phosphorylation de PKB sans moduler les niveaux protéiques d'IRS-1, et ces effets ne peuvent être restaurés lorsque Tpl2 est inhibé. Ces deux conditions de stimulations entraînent la production de facteurs différents qui vont engager des voies d'insulino-résistance différentes au sein des adipocytes. Et malgré une baisse de leur production suite à l'inhibition de Tpl2, les facteurs sécrétés restent suffisants pour induire une altération de la signalisation de l'insuline dans les adipocytes.

Inhiber Tpl2 pour diminuer l'inflammation du tissu adipeux et l'insulino-résistance : que nous enseignent les études des souris génétiquement modifiées ?

Pendant mes travaux de thèse, trois équipes ont publié les conséquences de l'inactivation de Tpl2 sur le développement de l'obésité, de l'inflammation du tissu adipeux et de l'insulino-résistance. Ces trois études démontrent que l'inactivation de Tpl2 ne modifie pas le développement de l'obésité induite chez la souris par un régime riche en lipides (Ballak et al., 2014 ; Lancaster et al., 2012; Perfield et al., 2011). Par contre les résultats sont contradictoires concernant l'inflammation du tissu adipeux et le développement de l'insulino-résistance. En effet la première étude du groupe de Greenberg trouve que les souris invalidées pour Tpl2 et rendues obèses suite à un régime riche en graisses (60% de graisses) ont une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une meilleure tolérance au glucose par rapport aux souris sauvages obèses. Ces améliorations métaboliques s'accompagnent d'une diminution de l'inflammation du tissu adipeux et du foie, avec une faible infiltration de macrophages et une diminution des expressions de nombreuses

cytokines inflammatoires et de marqueurs de macrophages pro-inflammatoires (Perfield et al., 2011).

Une deuxième étude publiée un an après, n'a pas confirmé ces résultats sur l'inflammation du tissu adipeux et l'insulino-résistance. En effet, l'inactivation de Tpl2 n'induisait pas d'amélioration et pouvait même avoir tendance à aggraver l'intolérance au glucose induite par des régimes riche en graisses (42% ou 60% de calories provenant des lipides) ; L'inflammation du tissu adipeux mesurée par l'expression de différents gènes codant pour des cytokines inflammatoires n'était pas diminuée chez les souris invalidées pour Tpl2 (Lancaster et al., 2012).

Enfin, la troisième étude (Ballak et al., 2014) montre que l'absence de Tpl2 dans le tissu adipeux de souris obèses réduit l'expression des ARNs de certaines cytokines et chimiokines en particulier l'IL-1 β , l'IL-6, et CXCL1. Par contre l'expression des ARNs d'autres médiateurs pro-inflammatoires dont le TNF α était inchangée. Concernant ce dernier, il faut cependant prendre en considération que Tpl2 contrôle essentiellement la maturation du pro-TNF- α en TNF α et que donc la mesure de l'ARNm n'est pas forcément en critère pertinent dans ces conditions (Dumitru et al., 2000; Rousseau et al., 2008 ; Soond et al., 2005). L'expression de Tpl2 a été également trouvée augmentée dans le tissu adipeux de patients obèses dont le BMI est supérieur à 30. De plus, l'expression de l'ARNm de Tpl2 dans le tissu adipeux de patients obèses corrélait avec l'expression des ARNm de l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8. Les résultats de cette étude indiquent que Tpl2 au sein du tissu adipeux d'obèses contrôle l'expression de certaines cytokines et pourrait donc en partie être impliquée dans l'inflammation de ce tissu. Cependant, comme pour l'étude de Lancaster et al, l'inactivation de Tpl2 ne permettait pas d'améliorer la tolérance au glucose ou à l'insuline des souris obèses. De plus, chez les patients obèses, l'expression de l'ARNm de Tpl2 ne semble pas être corrélée avec leur degrés d'insulino-résistance (Ballak et al., 2014).

Les résultats discordants de ces études sont difficiles à expliquer. Cependant des approches méthodologiques différentes pour mesurer l'insulino-sensibilité pourraient éventuellement expliquer ces différences. En effet, la technique du clamp Euglycémique-Hyperglycémique a été utilisée dans l'étude démontrant une amélioration de la sensibilité à l'insuline alors que dans les deux autres études des tests de tolérance au glucose (GTT) et à l'insuline (ITT) ont été réalisés. La technique du clamp est plus sensible et permet également de s'affranchir des mécanismes hormonaux compensateurs des variations de glycémie lors des GTT et ITT.

D'autre part, bien que des régimes contenant les mêmes pourcentages d'acide gras aient été utilisés, la composition en acides gras saturés pourrait être différente. Or, il a été montré que le phénotype métabolique des souris invalidées pour le TLR4 pouvait être influencé par cette teneur en acides gras (Davis et al., 2008). Un phénomène de ce type pourrait expliquer ces résultats différents puisque la voie de signalisation Tpl2 est en aval des TLR4 (Gantke et al., 2011).

Nos résultats suggèrent que l'activation de Tpl2 au sein des cellules immunitaires pourrait jouer un rôle important dans l'inflammation du tissu adipeux et les altérations de la physiologie des adipocytes. Il est donc possible que des modifications subtiles des populations de cellules immunitaires du tissu adipeux expliquent les différences entre ces études. De plus, des interactions complexes existent entre la flore intestinale, le système immunitaire et la génétique de l'hôte et ces interactions impactent fortement sur le phénotype métabolique de l'hôte (Burcelin, 2012 ; Nicholson et al., 2012). Il est donc possible au vu de nos résultats sur l'importance de Tpl2 dans les cellules immunitaires, que des différences de flore intestinale liées aux conditions d'hébergement des souris puissent expliquer la discordance entre les études. Ceci a été par exemple montré pour expliquer des résultats contradictoires concernant le phénotype métabolique des souris invalidées pour TLR2 (Caricilli et al., 2011 ; Caricilli et al., 2008).

Enfin, on peut également se poser la question d'une éventuelle mise en place de voies de signalisation compensatoires suite à la perte de Tpl2, et que suivant le nombre de générations qui suivent l'établissement de la lignée homozygote, ces phénomènes compensatoires masquent l'effet protecteur de la perte de Tpl2.

En résumé, les études de souris globalement invalidée pour Tpl2 ne nous permettent pas d'avoir une idée claire de l'importance ou non de cette kinase dans le développement de l'inflammation et de l'insulinorésistance associée à l'obésité.

D'autres études s'avèrent donc nécessaire pour déterminer si Tpl2 peut être considérée comme une cible intéressante contre les complications métaboliques de l'obésité. Il serait intéressant en particulier de :

- Etudier l'importance de Tpl2 dans les cellules T *in vitro* pour leur dialogue avec les adipocytes. Les cellules T jouant un rôle important dans l'inflammation du tissu adipeux lors de l'obésité (Exley et al., 2014; Mathis, 2013).
- D'étudier *in vivo*, la contribution de Tpl2 dans les cellules immunitaires pour le développement de l'inflammation du tissu adipeux et l'insulinorésistance. Des approches de transfert de moelle de souris invalidées pour Tpl2 dans des souris sauvages pourraient permettre de répondre à cette question. La génération de souris Tpl2flox permettrait également d'étudier les conséquences de l'absence de Tpl2 dans les différentes populations de cellules immunitaires et au-delà dans les différents tissus impliqués dans le contrôle de l'homéostasie glucidique.
- Une approche pharmacologique ciblant Tpl2 dans les souris obèses serait également intéressante et éviterait d'éventuels phénomènes de compensation. Les résultats présentés dans l'Article 3 sont prometteurs avec en particulier une amélioration du profil métabolique des souris diabétiques *db/db* traitées avec l'inhibiteur de Tpl2. Il reste maintenant à approfondir les effets de l'inhibition de Tpl2 en étudiant l'inflammation des différents organes tels que le foie et le tissu adipeux mais également d'étudier l'infiltration des cellules immunitaires dans ces tissus. L'étude des îlots pancréatiques est également cruciale au vue des résultats de l'article 3. Il faudrait confirmer ces résultats dans des modèles d'obésité non pas génétique mais induite par un régime riche en lipides.
- L'inhibiteur pharmacologique de Tpl2 n'a pas une bonne biodisponibilité et une amélioration de cet inhibiteur pour une utilisation *in vivo* est également souhaitable en collaboration avec des chimistes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abel, E. D., Peroni, O. D., Kim, J. K., Kim, Y.-B., Boss, O., Hadro, E., minnemann, T., Shulman, G. I., and Kahn, B. B. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409, 729-733.
- Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee, Y. H., Shoelson, S. E., and White, M. F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277, 1531-1537.
- Ahmed, M., and Gaffen, S. L. (2010). IL-17 in obesity and adipogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 449-453.
- Altintas, M. M., Azad, A., Nayer, B., Contreras, G., Zaias, J., Faul, C., Reiser, J., and Nayer, A. (2011). Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. *J Lipid Res* 52, 480-488.
- Altintas, M. M., Nayer, B., Walford, E. C., Johnson, K. B., Gaidosh, G., Reiser, J., De La Cruz-Munoz, N., Ortega, L. M., and Nayer, A. (2012). Leptin deficiency-induced obesity affects the density of mast cells in abdominal fat depots and lymph nodes in mice. *Lipids Health Dis* 11, 21.
- Amano, S. U., Cohen, J. L., Vangala, P., Tencerova, M., Nicolero, S. M., Yawe, J. C., Shen, Y., Czech, M. P., and Aouadi, M. (2014). Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab* 19, 162-171.
- Amar, J., Burcelin, R., Ruidavets, J. B., Cani, P. D., Fauvel, J., Alessi, M. C., Chamontin, B., and Ferrieres, J. (2008). Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* 87, 1219-1223.
- Amar, J., Chabo, C., Waget, A., Klopp, P., Vachoux, C., Bermudez-Humaran, L. G., Smirnova, N., Berge, M., Sulpice, T., Lahtinen, S., et al. (2011a). Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol Med* 3, 559-572.
- Amar, J., Serino, M., Lange, C., Chabo, C., Iacovoni, J., Mondot, S., Lepage, P., Klopp, C., Mariette, J., Bouchez, O., et al. (2011b). Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept. *Diabetologia* 54, 3055-3061.
- Andrade, V. L., Petruceli, E., Belo, V. A., Andrade-Fernandes, C. M., Caetano Russi, C. V., Bosco, A. A., Tanus-Santos, J. E., and Sandrim, V. C. Evaluation of plasmatic MMP-8, MMP-9, TIMP-1 and MPO levels in obese and lean women. *Clin Biochem* 45, 412-415.
- Antuna-Puente, B., Feve, B., Fellahi, S., and Bastard, J. P. (2008). Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 34, 2-11.
- Aouadi, M., Binetruy, B., Caron, L., Le Marchand-Brustel, Y., and Bost, F. (2006). Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie* 88, 1091-1098.
- Aouadi, M., Vangala, P., Yawe, J. C., Tencerova, M., Nicolero, S. M., Cohen, J. L., Shen, Y., and Czech, M. P. (2014). Lipid storage by adipose tissue macrophages regulates systemic glucose tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307, E374-383.
- Arkan, M. C., Hevener, A. L., Greten, F. R., Maeda, S., Li, Z. W., Long, J. M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., and Karin, M. (2005). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11, 191-198.
- Ashwell, J. D. (2006). The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 6, 532-540.

Attane, C., Foussal, C., Le Gonidec, S., Benani, A., Daviaud, D., Wanecq, E., Guzman-Ruiz, R., Dray, C., Bezaire, V., Rancoule, C., et al. (2012). Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes* 61, 310-320.

Austin, R. L., Rune, A., Bouzakri, K., Zierath, J. R., and Krook, A. (2008). siRNA-mediated reduction of inhibitor of nuclear factor-kappaB kinase prevents tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetes* 57, 2066-2073.

Babu, G. R., Jin, W., Norman, L., Waterfield, M., Chang, M., Wu, X., Zhang, M., and Sun, S. C. (2006). Phosphorylation of NF-kappaB1/p105 by oncoprotein kinase Tpl2: implications for a novel mechanism of Tpl2 regulation. *Biochim Biophys Acta* 1763, 174-181.

Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F., and Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15718-15723.

Ballak, D. B., van Essen, P., van Diepen, J. A., Jansen, H., Hijmans, A., Matsuguchi, T., Sparrer, H., Tack, C. J., Netea, M. G., Joosten, L. A., and Stienstra, R. (2014). MAP3K8 (TPL2/COT) affects obesity-induced adipose tissue inflammation without systemic effects in humans and in mice. *PLoS One* 9, e89615.

Baretic, M. (2013). Obesity drug therapy. *Minerva Endocrinol* 38, 245-254.

Bashan, N., Dorfman, K., Tarnovscki, T., Harman-Boehm, I., Liberty, I. F., Bluher, M., Ovadia, S., Maymon-Zilberstein, T., Potashnik, R., Stumvoll, M., et al. (2007). Mitogen-activated protein kinases, inhibitory-kappaB kinase, and insulin signaling in human omental versus subcutaneous adipose tissue in obesity. *Endocrinology* 148, 2955-2962.

Basile, K. J., Johnson, M. E., Xia, Q., and Grant, S. F. (2014). Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity: follow-up of findings from genome-wide association studies. *Int J Endocrinol* 2014, 769671.

Bayascas, J. R., Wullschleger, S., Sakamoto, K., Garcia-Martinez, J. M., Clacher, C., Komander, D., van Aalten, D. M., Boini, K. M., Lang, F., Lipina, C., et al. (2008). Mutation of the PDK1 PH domain inhibits protein kinase B/Akt, leading to small size and insulin resistance. *Mol Cell Biol* 28, 3258-3272.

Beinke, S., Deka, J., Lang, V., Belich, M. P., Walker, P. A., Howell, S., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J., and Ley, S. C. (2003). NF-kappaB1 p105 negatively regulates TPL-2 MEK kinase activity. *Mol Cell Biol* 23, 4739-4752.

Beinke, S., and Ley, S. C. (2004). Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* 382, 393-409.

Bell, C. G., Walley, A. J., and Froguel, P. (2005). The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet* 6, 221-234.

Benhamed, F., Denechaud, P. D., Lemoine, M., Robichon, C., Moldes, M., Bertrand-Michel, J., Ratzu, V., Serfaty, L., Housset, C., Capeau, J., et al. (2012). The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest* 122, 2176-2194.

Bennett, B. L., Satoh, Y., and Lewis, A. J. (2003). JNK: a new therapeutic target for diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 3, 420-425.

Berg, A. H., and Scherer, P. E. (2005). Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 96, 939-949.

Bertola, A., Ciucci, T., Rousseau, D., Bourlier, V., Duffaut, C., Bonnafous, S., Blin-Wakkach, C., Anty, R., Iannelli, A., Gugenheim, J., et al. (2012). Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes* 61, 2238-2247.

- Bertola, A., Deveau, V., Bonnafous, S., Rousseau, D., Anty, R., Wakkach, A., Dahman, M., Tordjman, J., Clement, K., McQuaid, S. E., et al. (2009). Elevated expression of osteopontin may be related to adipose tissue macrophage accumulation and liver steatosis in morbid obesity. *Diabetes* 58, 125-133.
- Bessard, A., Fremin, C., Ezan, F., Fautrel, A., Gailhouse, L., and Baffet, G. (2008). RNAi-mediated ERK2 knockdown inhibits growth of tumor cells in vitro and in vivo. *Oncogene* 27, 5315-5325.
- Biddinger, S. B., and Kahn, C. R. (2006). From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu Rev Physiol* 68, 123-158.
- Bjornholm, M., He, A. R., Attersand, A., Lake, S., Liu, S. C., Lienhard, G. E., Taylor, S., Arner, P., and Zierath, J. R. (2002). Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans. *Diabetologia* 45, 1697-1702.
- Blüher, M. (2012). Vaspin in obesity and diabetes: pathophysiological and clinical significance. *Endocrine* 41, 176-182.
- Bogoyevitch, M. A., and Arthur, P. G. (2008). Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JunK no more? *Biochim Biophys Acta* 1784, 76-93.
- Bonny, C., Oberson, A., Negri, S., Sauser, C., and Schorderet, D. F. (2001). Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. *Diabetes* 50, 77-82.
- Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., and Binetruy, B. (2005a). The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie* 87, 51-56.
- Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., Even, P., Belmonte, N., Prot, M., Dani, C., Hofman, P., Pages, G., Pouyssegur, J., et al. (2005b). The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes* 54, 402-411.
- Bost, F., Sahra, I. B., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J. F. (2012). Metformin and cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 24, 103-108.
- Boura-Halfon, S., and Zick, Y. (2009). Serine kinases of insulin receptor substrate proteins. *Vitam Horm* 80, 313-349.
- Bourlier, V., and Bouloumie, A. (2009). Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes Metab* 35, 251-260.
- Bourlier, V., Zakaroff-Girard, A., Miranville, A., De Barros, S., Maumus, M., Sengenès, C., Galitzky, J., Lafontan, M., Karpe, F., Frayn, K. N., and Bouloumie, A. (2008). Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation* 117, 806-815.
- Bouzakri, K., Karlsson, H. K., Vestergaard, H., Madsbad, S., Christiansen, E., and Zierath, J. R. (2006). IRS-1 Serine Phosphorylation and Insulin Resistance in Skeletal Muscle From Pancreas Transplant Recipients. *Diabetes* 55, 785-791.
- Bouzakri, K., Roques, M., Gual, P., Espinosa, S., Guebre-Egziabher, F., Riou, J. P., Laville, M., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J. F., and Vidal, H. (2003). Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 1319-1325.
- Bozulic, L., and Hemmings, B. A. (2009). PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Curr Opin Cell Biol* 21, 256-261.
- Brasier AR. (2006). The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol* 6. 111-30
- Bruce, K. D. (2014). Maternal and in utero determinants of type 2 diabetes risk in the young. *Curr Diab Rep* 14, 446.

Bu, L., Gao, M., Qu, S., and Liu, D. (2013). Intraperitoneal injection of clodronate liposomes eliminates visceral adipose macrophages and blocks high-fat diet-induced weight gain and development of insulin resistance. *Aaps J* 15, 1001-1011.

Burcelin, R. (2012). Regulation of metabolism: a cross talk between gut microbiota and its human host. *Physiology (Bethesda)* 27, 300-307.

Burcelin, R., Garidou, L., and Pomie, C. (2012). Immuno-microbiota cross and talk: the new paradigm of metabolic diseases. *Semin Immunol* 24, 67-74.

Burcelin, R., Serino, M., Chabo, C., Blasco-Baque, V., and Amar, J. (2011). Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetol* 48, 257-273.

Burcelin, R., Serino, M., Chabo, C., Garidou, L., Pomie, C., Courtney, M., Amar, J., and Bouloumie, A. (2013). Metagenome and metabolism: the tissue microbiota hypothesis. *Diabetes Obes Metab* 15 Suppl 3, 61-70.

Cai, D., Dhe-Paganon, S., Melendez, P. A., Lee, J., and Shoelson, S. E. (2003). Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 278, 25323-25330.

Cancello, R., and Clement, K. (2006). Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *Bjog* 113, 1141-1147.

Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., et al. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761-1772.

Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., and Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470-1481.

Cani, P. D., and Delzenne, N. M. (2009). The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des* 15, 1546-1558.

Cani, P. D., Osto, M., Geurts, L., and Everard, A. (2012). Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes* 3, 279-288.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84, 277-359.

Cao, H. (2014). Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J Endocrinol* 220, T47-59.

Caricilli, A., Picardi, P., de Abreu, L., Ueno, M., Prada, P., Ropelle, E., Hirabara, S., Castoldi, A., Vieira, P., Camara, N., et al. (2011). Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS biology* 9.

Caricilli, A. M., Nascimento, P. H., Pauli, J. R., Tsukumo, D. M., Velloso, L. A., Carnevali, J. B., and Saad, M. J. (2008). Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. *The Journal of endocrinology* 199, 399-406.

Cariou, B., Capitaine, N., Le Marcis, V., Vega, N., Bereziat, V., Kergoat, M., Laville, M., Girard, J., Vidal, H., and Burnol, A. F. (2004). Increased adipose tissue expression of Grb14 in several models of insulin resistance. *Faseb J* 18, 965-967. Epub 2004 Apr 2001.

Carlson, C. J., Koterski, S., Sciotti, R. J., Poccard, G. B., and Rondinone, C. M. (2003). Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes: potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression. *Diabetes* 52, 634-641.

- Casamayor, A., Morrice, N. A., and Alessi, D. R. (1999). Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo. *Biochem J* 342, 287-292.
- Caspar-Bauguil, S., Cousin, B., Galinier, A., Segafredo, C., Nibbelink, M., Andre, M., Casteilla, L., and Penicaud, L. (2005). Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett* 579, 3487-3492.
- Castan-Laurell, I., Boucher, J., Dray, C., Daviaud, D., Guigne, C., and Valet, P. (2005). Apelin, a novel adipokine over-produced in obesity: friend or foe? *Mol Cell Endocrinol* 245, 7-9.
- Castan-Laurell, I., Dray, C., Attane, C., Duparc, T., Knauf, C., and Valet, P. (2011). Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine* 40, 1-9.
- Castan-Laurell, I., Dray, C., Knauf, C., Kunduzova, O., and Valet, P. (2012). Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab* 23, 234-241.
- Cawthorn, W. P., Scheller, E. L., Learman, B. S., Parlee, S. D., Simon, B. R., Mori, H., Ning, X., Bree, A. J., Schell, B., Broome, D. T., et al. (2014). Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction. *Cell Metab* 20, 368-375.
- Chapman, J., Miles, P. D., Ofrecio, J. M., Neels, J. G., Yu, J. G., Resnik, J. L., Wilkes, J., Talukdar, S., Thapar, D., Johnson, K., and Sears, D. D. (2010). Osteopontin is required for the early onset of high fat diet-induced insulin resistance in mice. *PLoS One* 5, e13959.
- Chavey, C., Lazennec, G., Lagarrigue, S., Clape, C., Iankova, I., Teyssier, J., Annicotte, J. S., Schmidt, J., Matak, C., Yamamoto, H., et al. (2009). CXC ligand 5 is an adipose-tissue derived factor that links obesity to insulin resistance. *Cell Metab* 9, 339-349.
- Chechi, K., Nedergaard, J., and Richard, D. (2014). Brown adipose tissue as an anti-obesity tissue in humans. *Obes Rev* 15, 92-106.
- Chen, A., Mumick, S., Zhang, C., Lamb, J., Dai, H., Weingarth, D., Mudgett, J., Chen, H., MacNeil, D. J., Reitman, M. L., and Qian, S. (2005). Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. *Obes Res* 13, 1311-1320.
- Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M. H. (2001). MAP kinases. *Chem Rev* 101, 2449-2476.
- Chiariello, M., Bruni, C. B., and Bucci, C. (1999). The small GTPases Rab5a, Rab5b and Rab5c are differentially phosphorylated in vitro. *FEBS Lett* 453, 20-24.
- Chmelar, J., Chung, K. J., and Chavakis, T. (2013). The role of innate immune cells in obese adipose tissue inflammation and development of insulin resistance. *Thromb Haemost* 109, 399-406.
- Cho, C. H., Koh, Y. J., Han, J., Sung, H. K., Jong Lee, H., Morisada, T., Schwendener, R. A., Brekken, R. A., Kang, G., Oike, Y., et al. (2007). Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue. *Circ Res* 100, e47-57.
- Cho, J., Melnick, M., Solidakis, G. P., and Tschlis, P. N. (2005). Tpl2 (tumor progression locus 2) phosphorylation at Thr290 is induced by lipopolysaccharide via an Ikappa-B Kinase-beta-dependent pathway and is required for Tpl2 activation by external signals. *J Biol Chem* 280, 20442-20448.
- Cho, J., and Tschlis, P. N. (2005). Phosphorylation at Thr-290 regulates Tpl2 binding to NF-kappaB1/p105 and Tpl2 activation and degradation by lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2350-2355.

- Choi, H. S., Kang, B. S., Shim, J. H., Cho, Y. Y., Choi, B. Y., Bode, A. M., and Dong, Z. (2008). Cot, a novel kinase of histone H3, induces cellular transformation through up-regulation of c-fos transcriptional activity. *FASEB J* 22, 113-126.
- Christiansen, T., Richelsen, B., and Bruun, J. M. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int J Obes (Lond)* 29, 146-150.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A. S., and Obin, M. S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46, 2347-2355.
- Cipolletta, D. (2014). Adipose tissue-resident regulatory T cells: phenotypic specialization, functions and therapeutic potential. *Immunology* 142, 517-525.
- Cipolletta, D., Feuerer, M., Li, A., Kamei, N., Lee, J., Shoelson, S. E., Benoist, C., and Mathis, D. (2012). PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 486, 549-553.
- Cnop, M., Foufelle, F., and Velloso, L. A. (2011). Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med* 18, 59-68.
- Coenen, K., Gruen, M., Lee-Young, R., Puglisi, M., Wasserman, D., and Hasty, A. (2009). Impact of macrophage toll-like receptor 4 deficiency on macrophage infiltration into adipose tissue and the artery wall in mice. *Diabetologia* 52, 318-328.
- Cole, B. K., Morris, M. A., Grzesik, W. J., Leone, K. A., and Nadler, J. L. (2012). Adipose tissue-specific deletion of 12/15-lipoxygenase protects mice from the consequences of a high-fat diet. *Mediators Inflamm* 2012, 851798.
- Colquitt, J. L., Pickett, K., Loveman, E., and Frampton, G. K. (2014). Surgery for weight loss in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 8, CD003641.
- Cornier, M. A., Dabelea, D., Hernandez, T. L., Lindstrom, R. C., Steig, A. J., Stob, N. R., Van Pelt, R. E., Wang, H., and Eckel, R. H. (2008). The metabolic syndrome. *Endocr Rev* 29, 777-822.
- Cusi, K. (2010). The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 10, 306-315.
- Cuypers, J., Mathieu, C., and Benhalima, K. (2013). SGLT2-inhibitors: a novel class for the treatment of type 2 diabetes introduction of SGLT2-inhibitors in clinical practice. *Acta Clin Belg* 68, 287-293.
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y. H., Doria, A., et al. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360, 1509-1517.
- Czech, M. P., Tencerova, M., Pedersen, D. J., and Aouadi, M. (2013). Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia* 56, 949-964.
- Dahlman, I., Kaaman, M., Olsson, T., Tan, G. D., Bickerton, A. S., Wahlen, K., Andersson, J., Nordstrom, E. A., Blomqvist, L., Sjogren, A., et al. (2005). A unique role of monocyte chemoattractant protein 1 among chemokines in adipose tissue of obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 5834-5840.
- Das, S., Cho, J., Lambertz, I., Kelliher, M. A., Eliopoulos, A. G., Du, K., and Tschlis, P. N. (2005). Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF- κ B in a cell-type and stimulus-specific manner. *J Biol Chem* 280, 23748-23757.
- Davis, J. E., Gabler, N. K., Walker-Daniels, J., and Spurlock, M. E. (2008). Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring)* 16, 1248-1255.
- Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.

de Alvaro, C., Teruel, T., Hernandez, R., and Lorenzo, M. (2004). Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J Biol Chem* 279, 17070-17078.

de Ferranti, S., and Mozaffarian, D. (2008). The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* 54, 945-955.

Decicco-Skinner, K. L., Trovato, E. L., Simmons, J. K., Lepage, P. K., and Wiest, J. S. (2011). Loss of tumor progression locus 2 (tpl2) enhances tumorigenesis and inflammation in two-stage skin carcinogenesis. *Oncogene* 30, 389-397.

Delarue, J., and Magnan, C. (2007). Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10, 142-148.

Deng, T., Lyon, C. J., Minze, L. J., Lin, J., Zou, J., Liu, J. Z., Ren, Y., Yin, Z., Hamilton, D. J., Reardon, P. R., et al. (2013). Class II major histocompatibility complex plays an essential role in obesity-induced adipose inflammation. *Cell Metab* 17, 411-422.

Di Guglielmo, G. M., Drake, P. G., Baass, P. C., Authier, F., Posner, B. I., and Bergeron, J. J. (1998). Insulin receptor internalization and signalling. *Mol Cell Biochem* 182, 59-63.

Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., and Raptis, S. A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract* 93 Suppl 1, S52-59.

Diraison, F., Dusserre, E., Vidal, H., Sothier, M., and Beylot, M. (2002). Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E46-51.

Dominguez, P. M., and Ardavin, C. (2011). Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev* 234, 90-104.

Donath, M. Y., and Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 11, 98-107.

Doria, A., Patti, M. E., and Kahn, C. R. (2008). The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. *Cell Metab* 8, 186-200.

Dray, C., Knauf, C., Daviaud, D., Waget, A., Boucher, J., Buleon, M., Cani, P. D., Attane, C., Guigne, C., Carpenne, C., et al. (2008). Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8, 437-445.

Duffaut, C., Galitzky, J., Lafontan, M., and Bouloumie, A. (2009). Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 384, 482-485.

Dumitru, C. D., Ceci, J. D., Tsatsanis, C., Kontoyiannis, D., Stamatakis, K., Lin, J. H., Patriotis, C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Kollias, G., and Tscholis, P. N. (2000). TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 103, 1071-1083.

Eck, M. J., Dhe-Paganon, S., Trub, T., Nolte, R. T., and Shoelson, S. E. (1996). Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell* 85, 695-705.

Eguez, L., Lee, A., Chavez, J. A., Miinea, C. P., Kane, S., Lienhard, G. E., and McGraw, T. E. (2005). Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell Metab* 2, 263-272.

Ehses, J., Meier, D., Wueest, S., Rytka, J., Boller, S., Wielinga, P., Schraenen, A., Lemaire, K., Debray, S., Van Lommel, L., et al. (2010). Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet. *Diabetologia* 53, 1795-1806.

El-Sayed Moustafa, J. S., and Froguel, P. (2013). From obesity genetics to the future of personalized obesity therapy. *Nat Rev Endocrinol* 9, 402-413.

Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N., and Levy, R. (2008). Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J Lipid Res* 49, 1894-1903.

Eliopoulos, A. G., Dumitru, C. D., Wang, C. C., Cho, J., and Tschlis, P. N. (2002). Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *Embo J* 21, 4831-4840.

Eliopoulos, A. G., Wang, C. C., Dumitru, C. D., and Tschlis, P. N. (2003). Tpl2 transduces CD40 and TNF signals that activate ERK and regulates IgE induction by CD40. *Embo J* 22, 3855-3864.

Emanuelli, B., Eberle, D., Suzuki, R., and Kahn, C. R. (2008). Overexpression of the dual-specificity phosphatase MKP-4/DUSP-9 protects against stress-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3545-3550.

Emanuelli, B., Peraldi, P., Filloux, C., Chavey, C., Freidinger, K., Hilton, D. J., Hotamisligil, G. S., and Van Obberghen, E. (2001). SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- α in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem* 276, 47944-47949. Epub 42001 Oct 47916.

Erny, K. M., Peli, J., Lambert, J. F., Muller, V., and Diggelmann, H. (1996). Involvement of the Tpl-2/cot oncogene in MMTV tumorigenesis. *Oncogene* 13, 2015-2020.

Exley, M. A., Hand, L., O'Shea, D., and Lynch, L. (2014). Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. *J Endocrinol* 223, R41-R48.

Fantin, V. R., Keller, S. R., Lienhard, G. E., and Wang, L. M. (1999). Insulin receptor substrate 4 supports insulin- and interleukin 4-stimulated proliferation of hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 260, 718-723.

Farese, R. V. (2002). Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E1-11.

Farooqi, I. S. (2014). EJE PRIZE 2012: Obesity: from genes to behaviour. *Eur J Endocrinol* 171, R191-R195.

Farooqi, I. S., and O'Rahilly, S. (2004). Monogenic human obesity syndromes. *Recent Prog Horm Res* 59, 409-424.

Fasshauer, M., Kralisch, S., Klier, M., Lossner, U., Bluher, M., Klein, J., and Paschke, R. (2003). Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 1045-1050.

Feng, B., Jiao, P., Nie, Y., Kim, T., Jun, D., van Rooijen, N., Yang, Z., and Xu, H. Clodronate liposomes improve metabolic profile and reduce visceral adipose macrophage content in diet-induced obese mice. *PLoS One* 6, e24358.

Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A. B., Benoist, C., Shoelson, S., and Mathis, D. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 15, 930-939.

Flamment, M., Hajduch, E., Ferre, P., and Fufelle, F. (2012). New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 23, 381-390.

Fleischman, A., Shoelson, S. E., Bernier, R., and Goldfine, A. B. (2008). Salsalate improves glycemia and inflammatory parameters in obese young adults. *Diabetes Care* 31, 289-294.

Foltz, I. N., Lee, J. C., Young, P. R., and Schrader, J. W. (1997). Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 272, 3296-3301.

- Forsythe, L. K., Wallace, J. M., and Livingstone, M. B. (2008). Obesity and inflammation: the effects of weight loss. *Nutr Res Rev* 21, 117-133.
- Foti, M., Porcheron, G., Fournier, M., Maeder, C., and Carpentier, J. L. (2007). The neck of caveolae is a distinct plasma membrane subdomain that concentrates insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1242-1247.
- Fremin, C., Ezan, F., Boisselier, P., Bessard, A., Pages, G., Pouyssegur, J., and Baffet, G. (2007). ERK2 but not ERK1 plays a key role in hepatocyte replication: an RNAi-mediated ERK2 knockdown approach in wild-type and ERK1 null hepatocytes. *Hepatology* 45, 1035-1045.
- Fresno, M., Alvarez, R., and Cuesta, N. (2011). Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity. *Archives of physiology and biochemistry* 117, 151-164.
- Fujii, N., Boppart, M. D., Dufresne, S. D., Crowley, P. F., Jozsi, A. C., Sakamoto, K., Yu, H., Aschenbach, W. G., Kim, S., Miyazaki, H., et al. (2004). Overexpression or ablation of JNK in skeletal muscle has no effect on glycogen synthase activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C200-208.
- Fujishiro, M., Gotoh, Y., Katagiri, H., Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Onishi, Y., Ono, H., Abe, M., Shojima, N., et al. (2003). Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 17, 487-497. Epub 2002 Dec 2005.
- Furet, J. P., Kong, L. C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J. L., Mariat, D., Corthier, G., Dore, J., Henegar, C., et al. (2010). Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 59, 3049-3057.
- Galic, S., Oakhill, J. S., and Steinberg, G. R. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 316, 129-139.
- Gandara, M. L., Lopez, P., Hernando, R., Castano, J. G., and Alemany, S. (2003). The COOH-terminal domain of wild-type Cot regulates its stability and kinase specific activity. *Mol Cell Biol* 23, 7377-7390.
- Gantke, T., Sriskantharajah, S., and Ley, S. C. (2011). Regulation and function of TPL-2, an IkappaB kinase-regulated MAP kinase kinase kinase. *Cell Res* 21, 131-145.
- Gantke, T., Sriskantharajah, S., Sadowski, M., and Ley, S. C. (2012). IkappaB kinase regulation of the TPL-2/ERK MAPK pathway. *Immunol Rev* 246, 168-182.
- Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., He, Q., McGuinness, O. P., and Ye, J. (2009). Inactivation of NF-kappaB p50 leads to insulin sensitization in liver through post-translational inhibition of p70S6K. *J Biol Chem* 284, 18368-18376.
- Gao, Z., Zuberi, A., Quon, M., Dong, Z., and Ye, J. (2003). Aspirin inhibits serine phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 in Tumor Necrosis Factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J Biol Chem* 278, 24944-24950.
- Gargalovic, P. S., Gharavi, N. M., Clark, M. J., Pagnon, J., Yang, W. P., He, A., Truong, A., Baruch-Oren, T., Berliner, J. A., Kirchgesner, T. G., and Lusis, A. J. (2006). The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2490-2496.
- Gerhardt, C. C., Romero, I. A., Canello, R., Camoin, L., and Strosberg, A. D. (2001). Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 175, 81-92.
- Gerits, N., Kostenko, S., and Moens, U. (2007). In vivo functions of mitogen-activated protein kinases: conclusions from knock-in and knock-out mice. *Transgenic Res* 16, 281-314.

- Giordano, A., Murano, I., Mondini, E., Perugini, J., Smorlesi, A., Severi, I., Barazzoni, R., Scherer, P. E., and Cinti, S. (2013). Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *J Lipid Res* 54, 2423-2436.
- Giovannone, B., Scaldaferri, M. L., Federici, M., Porzio, O., Lauro, D., Fusco, A., Sbraccia, P., Borboni, P., Lauro, R., and Sesti, G. (2000). Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes Metab Res Rev* 16, 434-441.
- Giralt, M., and Villarroya, F. (2013). White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology* 154, 2992-3000.
- Gkirtzimanaki, K., Gkouskou, K. K., Oleksiewicz, U., Nikolaidis, G., Vyrta, D., Liontos, M., Pelekanou, V., Kanellis, D. C., Evangelou, K., Stathopoulos, E. N., et al. (2013). TPL2 kinase is a suppressor of lung carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1470-1479.
- Goldfine, A. B., Silver, R., Aldhahi, W., Cai, D., Tatro, E., Lee, J., and Shoelson, S. E. (2008). Use of Salsalate to Target Inflammation in the Treatment of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Clin Transl Sci* 1, 36-43.
- González-Pérez, A., and Claria, J. (2010). Resolution of adipose tissue inflammation. *ScientificWorldJournal* 10, 832-856.
- Goossens, G. H., Bizzarri, A., Venteclef, N., Essers, Y., Cleutjens, J. P., Konings, E., Jocken, J. W., Cajlakovic, M., Ribitsch, V., Clement, K., and Blaak, E. E. (2011). Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation. *Circulation* 124, 67-76.
- Greene, M. W., Morrice, N., Garofalo, R. S., and Roth, R. A. (2004). Modulation of human insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by protein kinase Cdelta. *Biochem J* 378, 105-116.
- Gregor, M. F., and Hotamisligil, G. S. (2007). Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* 48, 1905-1914.
- Gregor, M. F., and Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 29, 415-445.
- Gregor, M. F., Yang, L., Fabbrini, E., Mohammed, B. S., Eagon, J. C., Hotamisligil, G. S., and Klein, S. (2009). Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 58, 693-700.
- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J. F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87, 99-109.
- Hajri, T., and Abumrad, N. A. (2002). Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu Rev Nutr* 22, 383-415.
- Han, M. S., Jung, D. Y., Morel, C., Lakhani, S. A., Kim, J. K., Flavell, R. A., and Davis, R. J. (2013). JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science* 339, 218-222.
- Hardouin, P., Pansini, V., and Cortet, B. (2014). Bone marrow fat. *Joint Bone Spine* 81, 313-319.
- Hatzia Apostolou, M., Koukos, G., Polyarchou, C., Kottakis, F., Serebrennikova, O., Kuliopulos, A., and Tsihchlis, P. N. (2011). Tumor progression locus 2 mediates signal-induced increases in cytoplasmic calcium and cell migration. *Sci Signal* 4, ra55.
- Hatzia Apostolou, M., Polyarchou, C., Panutsopoulos, D., Covic, L., and Tsihchlis, P. N. (2008). Proteinase-activated receptor-1-triggered activation of tumor progression locus-2 promotes actin cytoskeleton reorganization and cell migration. *Cancer Res* 68, 1851-1861.

- Hauner, H. (2004). The new concept of adipose tissue function. *Physiol Behav* 83, 653-658.
- Himes, R., and Smith, C. (2010). Tlr2 is critical for diet-induced metabolic syndrome in a murine model. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 731-739.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G. S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333-336.
- Hodson, L., Humphreys, S. M., Karpe, F., and Frayn, K. N. (2013). Metabolic signatures of human adipose tissue hypoxia in obesity. *Diabetes* 62, 1417-1425.
- Horrillo, R., Gonzalez-Periz, A., Martinez-Clemente, M., Lopez-Parra, M., Ferre, N., Titos, E., Moran-Salvador, E., Deulofeu, R., Arroyo, V., and Claria, J. (2010). 5-lipoxygenase activating protein signals adipose tissue inflammation and lipid dysfunction in experimental obesity. *J Immunol* 184, 3978-3987.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., and Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.
- Huber, J., Kiefer, F. W., Zeyda, M., Ludvik, B., Silberhumer, G. R., Prager, G., Zlabinger, G. J., and Stulnig, T. M. (2008). CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 3215-3221.
- Huh, J. Y., Kim, J. I., Park, Y. J., Hwang, I. J., Lee, Y. S., Sohn, J. H., Lee, S. K., Alfadda, A. A., Kim, S. S., Choi, S. H., et al. (2013). A novel function of adipocytes in lipid antigen presentation to iNKT cells. *Mol Cell Biol* 33, 328-339.
- Hundal, R. S., Petersen, K. F., Mayerson, A. B., Randhawa, P. S., Inzucchi, S., Shoelson, S. E., and Shulman, G. I. (2002). Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 109, 1321-1326.
- Imajo, M., Tsuchiya, Y., and Nishida, E. (2006). Regulatory mechanisms and functions of MAP kinase signaling pathways. *IUBMB Life* 58, 312-317.
- Inouye, K. E., Shi, H., Howard, J. K., Daly, C. H., Lord, G. M., Rollins, B. J., and Flier, J. S. (2007). Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes* 56, 2242-2250.
- Ishijima, Y., Ohmori, S., and Ohneda, K. (2013). Mast cell deficiency results in the accumulation of preadipocytes in adipose tissue in both obese and non-obese mice. *FEBS Open Bio* 4, 18-24.
- Jaeschke, A., Czech, M. P., and Davis, R. J. (2004). An essential role of the JIP1 scaffold protein for JNK activation in adipose tissue. *Genes Dev* 18, 1976-1980.
- Jager, J., Gremeaux, T., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J. F. (2007). Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 148, 241-251.
- Jager, J., Gremeaux, T., Gonzalez, T., Bonnafous, S., Debard, C., Laville, M., Vidal, H., Tran, A., Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., et al. (2010). The Tpl2 kinase is up-regulated in adipose tissue in obesity and may mediate IL-1 β and TNF- α effects on ERK activation and lipolysis. *Diabetes* 59, 61-70.
- Jaikanth, C., Gurumurthy, P., Cherian, K. M., and Indhumathi, T. (2013). Emergence of omentin as a pleiotropic adipocytokine. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 121, 377-383.
- JAMA,(2001). Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama* 285, 2486-2497.

- Jeong, J. H., Bhatia, A., Toth, Z., Oh, S., Inn, K. S., Liao, C. P., Roy-Burman, P., Melamed, J., Coetzee, G. A., and Jung, J. U. (2011). TPL2/COT/MAP3K8 (TPL2) activation promotes androgen depletion-independent (ADI) prostate cancer growth. *PLoS One* 6, e16205.
- Jiao, P., Ma, J., Feng, B., Zhang, H., Diehl, J. A., Chin, Y. E., Yan, W., and Xu, H. (2011). FFA-induced adipocyte inflammation and insulin resistance: involvement of ER stress and IKKbeta pathways. *Obesity (Silver Spring)* 19, 483-491.
- Juge-Aubry, C. E., Somm, E., Pernin, A., Alizadeh, N., Giusti, V., Dayer, J. M., and Meier, C. A. (2005). Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. *Cytokine* 29, 270-274.
- Kaddai, V., Gonzalez, T., Keslair, F., Gremeaux, T., Bonnafous, S., Gugenheim, J., Tran, A., Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., and Cormont, M. (2009). Rab4b is a small GTPase involved in the control of the glucose transporter GLUT4 localization in adipocyte. *PLoS One* 4, e5257.
- Kaddai, V., Le Marchand-Brustel, Y., and Cormont, M. (2008). Rab proteins in endocytosis and Glut4 trafficking. *Acta Physiol (Oxf)* 192, 75-88.
- Kahles, F., Findeisen, H. M., and Bruemmer, D. (2014). Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Mol Metab* 3, 384-393.
- Kaiser, F., Cook, D., Papoutsopoulou, S., Rajsbaum, R., Wu, X., Yang, H. T., Grant, S., Ricciardi-Castagnoli, P., Tschlis, P. N., Ley, S. C., and O'Garra, A. (2009). TPL-2 negatively regulates interferon-beta production in macrophages and myeloid dendritic cells. *J Exp Med* 206, 1863-1871.
- Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N., Ohtsuka-Kowatari, N., Kumagai, K., Sakamoto, K., Kobayashi, M., et al. (2006). Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* 281, 26602-26614.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., and Kasuga, M. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116, 1494-1505.
- Kaneki, M., Shimizu, N., Yamada, D., and Chang, K. (2007). Nitrosative stress and pathogenesis of insulin resistance. *Antioxid Redox Signal* 9, 319-329.
- Kang, K., Reilly, S. M., Karabacak, V., Gangl, M. R., Fitzgerald, K., Hatano, B., and Lee, C. H. (2008). Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab* 7, 485-495.
- Kawasaki, N., Asada, R., Saito, A., Kanemoto, S., and Imaizumi, K. (2012). Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Sci Rep* 2, 799.
- Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C. C., LaPoint, K., and McIntosh, M. (2009). Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr* 139, 1-4.
- Keophiphath, M., Achard, V., Henegar, C., Rouault, C., Clement, K., and Lacasa, D. (2009). Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol Endocrinol* 23, 11-24.
- Keophiphath, M., Rouault, C., Divoux, A., Clement, K., and Lacasa, D. (2010). CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 39-45.
- Khoo, S., Gibson, T. B., Arnette, D., Lawrence, M., January, B., McGlynn, K., Vanderbilt, C. A., Griffen, S. C., German, M. S., and Cobb, M. H. (2004). MAP kinases and their roles in pancreatic beta-cells. *Cell Biochem Biophys* 40, 191-200.

- Kiefer, F. W., Zeyda, M., Gollinger, K., Pfau, B., Neuhofer, A., Weichhart, T., Saemann, M. D., Geyeregger, R., Schleiderer, M., Kenner, L., and Stulnig, T. M. (2010). Neutralization of osteopontin inhibits obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Diabetes* 59, 935-946.
- Kim, C. S., Park, H. S., Kawada, T., Kim, J. H., Lim, D., Hubbard, N. E., Kwon, B. S., Erickson, K. L., and Yu, R. (2006). Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes (Lond)* 30, 1347-1355.
- Kim, D., Kim, J., Yoon, J. H., Ghim, J., Yea, K., Song, P., Park, S., Lee, A., Hong, C. P., Jang, M. S., et al. (2014). CXCL12 secreted from adipose tissue recruits macrophages and induces insulin resistance in mice. *Diabetologia* 57, 1456-1465.
- Kim, J., Kim, Y., Fillmore, J., Chen, Y., Moore, I., Lee, J., Yuan, M., Li, Z., Karin, M., Perret, P., et al. (2001). Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 108, 437-446.
- Kim, K. Y., Kim, J. K., Jeon, J. H., Yoon, S. R., Choi, I., and Yang, Y. (2005). c-Jun N-terminal kinase is involved in the suppression of adiponectin expression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 460-467.
- Kim, S., Joe, Y., Jeong, S. O., Zheng, M., Back, S. H., Park, S. W., Ryter, S. W., and Chung, H. T. (2013). Endoplasmic reticulum stress is sufficient for the induction of IL-1beta production via activation of the NF-kappaB and inflammasome pathways. *Innate Immun.*
- Kitade, H., Sawamoto, K., Nagashimada, M., Inoue, H., Yamamoto, Y., Sai, Y., Takamura, T., Yamamoto, H., Miyamoto, K., Ginsberg, H. N., et al. (2012). CCR5 plays a critical role in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status. *Diabetes* 61, 1680-1690.
- Kloting, N., Kovacs, P., Kern, M., Heiker, J. T., Fasshauer, M., Schon, M. R., Stumvoll, M., Beck-Sickinger, A. G., and Bluher, M. (2011). Central vaspin administration acutely reduces food intake and has sustained blood glucose-lowering effects. *Diabetologia* 54, 1819-1823.
- Klover, P. J., and Mooney, R. A. (2004). Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 753-758.
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2, 289-305.
- Kolditz, C. I., and Langin, D. (2010). Adipose tissue lipolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13, 377-381.
- Konner, A. C., and Bruning, J. C. (2011). Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 22, 16-23.
- Kontoyiannis, D., Boulougouris, G., Manoloukos, M., Armaka, M., Apostolaki, M., Pizarro, T., Kotlyarov, A., Forster, I., Flavell, R., Gaestel, M., et al. (2002). Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 196, 1563-1574.
- Kouyama, K., Miyake, K., Zenibayashi, M., Hirota, Y., Teranishi, T., Tamori, Y., Kanda, H., Sakaguchi, K., Ohara, T., and Kasuga, M. (2007). Association of serum MCP-1 concentration and MCP-1 polymorphism with insulin resistance in Japanese individuals with obese type 2 diabetes. *Kobe J Med Sci* 53, 345-354.
- Kunduzova, O., Alet, N., Delesque-Touchard, N., Millet, L., Castan-Laurell, I., Muller, C., Dray, C., Schaeffer, P., Herault, J. P., Savi, P., et al. (2008). Apelin/APJ signaling system: a potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes. *FASEB J* 22, 4146-4153.

- Kuo, L. H., Tsai, P. J., Jiang, M. J., Chuang, Y. L., Yu, L., Lai, K. T. A., and Tsai, Y. S. (2011). Toll-like receptor 2 deficiency improves insulin sensitivity and hepatic insulin signalling in the mouse. *Diabetologia* 54, 168-179.
- Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81, 807-869.
- Lacasa, D., Taleb, S., Keophiphath, M., Miranville, A., and Clement, K. (2007). Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology* 148, 868-877.
- Lafontan, M., and Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 48, 275-297.
- Lamos, E. L., Stein, S. A., and Davis, S. N. (2013). Sulfonylureas and meglitinides: historical and contemporary issues. *Panminerva Med* 55, 239-251.
- Lancaster, G. I., Kowalski, G. M., Estevez, E., Kraakman, M. J., Grigoriadis, G., Febbraio, M. A., Gerondakis, S., and Banerjee, A. (2012). Tumor progression locus 2 (Tpl2) deficiency does not protect against obesity-induced metabolic disease. *PLoS One* 7, e39100.
- Lang, V., Symons, A., Watton, S. J., Janzen, J., Soneji, Y., Beinke, S., Howell, S., and Ley, S. C. (2004). ABIN-2 forms a ternary complex with TPL-2 and NF-kappa B1 p105 and is essential for TPL-2 protein stability. *Mol Cell Biol* 24, 5235-5248.
- Langeveld, M., and Aerts, J. M. (2009). Glycosphingolipids and insulin resistance. *Prog Lipid Res* 48, 196-205.
- Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., and Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 30, 294-309.
- Larsen, C. M., Wadt, K. A., Juhl, L. F., Andersen, H. U., Karlsen, A. E., Su, M. S., Seedorf, K., Shapiro, L., Dinarello, C. A., and Mandrup-Poulsen, T. (1998). Interleukin-1beta-induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 273, 15294-15300.
- Larsson, B., Svardsudd, K., Welin, L., Wilhelmsen, L., Bjorntorp, P., and Tibblin, G. (1984). Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913. *Br Med J (Clin Res Ed)* 288, 1401-1404.
- Laugerette, F., Vors, C., Geloën, A., Chauvin, M. A., Soulage, C., Lambert-Porcheron, S., Peretti, N., Alligier, M., Burcelin, R., Laville, M., et al. (2011). Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. *J Nutr Biochem* 22, 53-59.
- Laurencikiene, J., van Harmelen, V., Arvidsson Nordstrom, E., Dicker, A., Blomqvist, L., Naslund, E., Langin, D., Arner, P., and Ryden, M. (2007). NF-kappaB is important for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *J Lipid Res* 48, 1069-1077.
- Lee, B. C., and Lee, J. (2014). Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta* 1842, 446-462.
- Lee, H. W., Joo, K. M., Lim, J. E., Cho, H. J., Cho, H. J., Park, M. C., Seol, H. J., Seo, S. I., Lee, J. I., Kim, S., et al. (2013a). Tpl2 kinase impacts tumor growth and metastasis of clear cell renal cell carcinoma. *Mol Cancer Res* 11, 1375-1386.
- Lee, S. J., Pfluger, P. T., Kim, J. Y., Nogueiras, R., Duran, A., Pages, G., Pouyssegur, J., Tschop, M. H., Diaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (2010). A functional role for the p62-ERK1 axis in the control of energy homeostasis and adipogenesis. *EMBO Rep* 11, 226-232.

- Lee, Y. H., Petkova, A. P., and Granneman, J. G. (2013b). Identification of an adipogenic niche for adipose tissue remodeling and restoration. *Cell Metab* 18, 355-367.
- Lee, Y. S., Kim, J. W., Osborne, O., Oh da, Y., Sasik, R., Schenk, S., Chen, A., Chung, H., Murphy, A., Watkins, S. M., et al. (2014). Increased adipocyte O₂ consumption triggers HIF-1 α , causing inflammation and insulin resistance in obesity. *Cell* 157, 1339-1352.
- Leto, D., and Saltiel, A. R. (2012). Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 383-396.
- Levy-Toledano, R., Taouis, M., Blaettler, D. H., Gorden, P., and Taylor, S. I. (1994). Insulin-induced activation of phosphatidyl inositol 3-kinase. Demonstration that the p85 subunit binds directly to the COOH terminus of the insulin receptor in intact cells. *J Biol Chem* 269, 31178-31182.
- Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., and Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11070-11075.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., and Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023.
- Li, P., Lu, M., Nguyen, M. T., Bae, E. J., Chapman, J., Feng, D., Hawkins, M., Pessin, J. E., Sears, D. D., Nguyen, A. K., et al. (2010). Functional heterogeneity of CD11c-positive adipose tissue macrophages in diet-induced obese mice. *J Biol Chem* 285, 15333-15345.
- Li, Z. W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999). The IKK β subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* 189, 1839-1845.
- Lipina, C., and Hundal, H. S. (2011). Sphingolipids: agents provocateurs in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetologia* 54, 1596-1607.
- Liu, G., and Rondinone, C. M. (2005). JNK: bridging the insulin signaling and inflammatory pathway. *Curr Opin Investig Drugs* 6, 979-987.
- Liu, H. Y., Collins, Q. F., Xiong, Y., Moukdar, F., Lupo, E. G., Jr., Liu, Z., and Cao, W. (2007). Prolonged treatment of primary hepatocytes with oleate induces insulin resistance through p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 282, 14205-14212.
- Liu, J., Divoux, A., Sun, J., Zhang, J., Clement, K., Glickman, J. N., Sukhova, G. K., Wolters, P. J., Du, J., Gorgun, C. Z., et al. (2009). Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med* 15, 940-945.
- Liu, Y. F., Herschkovitz, A., Boura-Halfon, S., Ronen, D., Paz, K., Leroith, D., and Zick, Y. (2004). Serine phosphorylation proximal to its phosphotyrosine binding domain inhibits insulin receptor substrate 1 function and promotes insulin resistance. *Mol Cell Biol* 24, 9668-9681.
- Lo, L. W., Cheng, J. J., Chiu, J. J., Wung, B. S., Liu, Y. C., and Wang, D. L. (2001). Endothelial exposure to hypoxia induces Egr-1 expression involving PKC α -mediated Ras/Raf-1/ERK1/2 pathway. *J Cell Physiol* 188, 304-312.
- Lolmede, K., Duffaut, C., Zakaroff-Girard, A., and Bouloumie, A. (2011). Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders. *Diabetes Metab* 37, 283-290.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., and Saltiel, A. R. (2007a). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117, 175-184.

- Lumeng, C. N., DelProposto, J. B., Westcott, D. J., and Saltiel, A. R. (2008). Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* 57, 3239-3246.
- Lumeng, C. N., Deyoung, S. M., and Saltiel, A. R. (2007b). Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E166-174.
- Lynch, L., Nowak, M., Varghese, B., Clark, J., Hogan, A. E., Toxavidis, V., Balk, S. P., O'Shea, D., O'Farrelly, C., and Exley, M. A. (2012). Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* 37, 574-587.
- Lynch, L., O'Shea, D., Winter, D. C., Geoghegan, J., Doherty, D. G., and O'Farrelly, C. (2009). Invariant NKT cells and CD1d(+) cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. *Eur J Immunol* 39, 1893-1901.
- Maddux, B. A., and Goldfine, I. D. (2000). Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit. *Diabetes* 49, 13-19.
- Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Marks, D. H. (2013). Drug utilization, safety and clinical use of Actos and Avandia. *Int J Risk Saf Med* 25, 39-51.
- Mathis, D. (2013). Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metab* 17, 851-859.
- McGown, C., Birerdinc, A., and Younossi, Z. M. (2014). Adipose tissue as an endocrine organ. *Clin Liver Dis* 18, 41-58.
- McNelis, J. C., and Olefsky, J. M. (2014). Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity* 41, 36-48.
- Meijer, K., de Vries, M., Al-Lahham, S., Bruinenberg, M., Weening, D., Dijkstra, M., Kloosterhuis, N., van der Leij, R. J., van der Want, H., Kroesen, B. J., et al. (2011). Human primary adipocytes exhibit immune cell function: adipocytes prime inflammation independent of macrophages. *PLoS One* 6, e17154.
- Mellor, P., Furber, L. A., Nyarko, J. N., and Anderson, D. H. (2012). Multiple roles for the p85alpha isoform in the regulation and function of PI3K signalling and receptor trafficking. *Biochem J* 441, 23-37.
- Membrez, M., Blancher, F., Jaquet, M., Bibiloni, R., Cani, P. D., Burcelin, R. G., Cortesy, I., Mace, K., and Chou, C. J. (2008). Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEB J* 22, 2416-2426.
- Mielke, L. A., Elkins, K. L., Wei, L., Starr, R., Tsichlis, P. N., O'Shea, J. J., and Watford, W. T. (2009). Tumor progression locus 2 (Map3k8) is critical for host defense against *listeria monocytogenes* and IL-1beta production. *J Immunol* 183, 7984-7993.
- Miles, J. M., and Nelson, R. H. (2007). Contribution of triglyceride-rich lipoproteins to plasma free fatty acids. *Horm Metab Res* 39, 726-729.
- Minehira, K., Vega, N., Vidal, H., Acheson, K., and Tappy, L. (2004). Effect of carbohydrate overfeeding on whole body macronutrient metabolism and expression of lipogenic enzymes in adipose tissue of lean and overweight humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 1291-1298.
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews* 22, 240.
- Molofsky, A. B., Nussbaum, J. C., Liang, H. E., Van Dyken, S. J., Cheng, L. E., Mohapatra, A., Chawla, A., and Locksley, R. M. (2013). Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J Exp Med* 210, 535-549.

- Moroz, E., Carlin, S., Dyomina, K., Burke, S., Thaler, H. T., Blasberg, R., and Serganova, I. (2009). Real-time imaging of HIF-1 α stabilization and degradation. *PLoS One* 4, e5077.
- Morris, D. L., Cho, K. W., Delproposto, J. L., Oatmen, K. E., Geletka, L. M., Martinez-Santibanez, G., Singer, K., and Lumeng, C. N. (2013). Adipose tissue macrophages function as antigen-presenting cells and regulate adipose tissue CD4⁺ T cells in mice. *Diabetes* 62, 2762-2772.
- Morris, D. L., Oatmen, K. E., Wang, T., DelProposto, J. L., and Lumeng, C. N. (2012). CX3CR1 deficiency does not influence trafficking of adipose tissue macrophages in mice with diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)* 20, 1189-1199.
- Mothe-Satney, I., Filloux, C., Amghar, H., Pons, C., Bourlier, V., Galitzky, J., Grimaldi, P. A., Feral, C. C., Bouloumie, A., Van Obberghen, E., and Neels, J. G. (2012). Adipocytes secrete leukotrienes: contribution to obesity-associated inflammation and insulin resistance in mice. *Diabetes* 61, 2311-2319.
- Mothe, I., and Van Obberghen, E. (1996). Phosphorylation of the insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662 and 731, modulates insulin action. *J Biol Chem* 271, 11222-11227.
- Nakae, J., Kitamura, T., Ogawa, W., Kasuga, M., and Accili, D. (2001). Insulin regulation of gene expression through the forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) requires kinases distinct from Akt. *Biochemistry* 40, 11768-11776.
- Nakamura, T., Arduini, A., Baccaro, B., Furuhashi, M., and Hotamisligil, G. S. (2014). Small-molecule inhibitors of PKR improve glucose homeostasis in obese diabetic mice. *Diabetes* 63, 526-534.
- Nakamura, T., Furuhashi, M., Li, P., Cao, H., Tuncman, G., Sonenberg, N., Gorgun, C. Z., and Hotamisligil, G. S. (2010). Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell* 140, 338-348.
- Nakao, R., Hirasaka, K., Goto, J., Ishidoh, K., Yamada, C., Ohno, A., Okumura, Y., Nonaka, I., Yasutomo, K., Baldwin, K. M., et al. (2009). Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol* 29, 4798-4811.
- Nara, N., Nakayama, Y., Okamoto, S., Tamura, H., Kiyono, M., Muraoka, M., Tanaka, K., Taya, C., Shitara, H., Ishii, R., et al. (2007). Disruption of CXC motif chemokine ligand-14 in mice ameliorates obesity-induced insulin resistance. *J Biol Chem* 282, 30794-30803.
- Nedergaard, J., Ricquier, D., and Kozak, L. P. (2005). Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects. *EMBO Rep* 6, 917-921.
- Nguyen, M., Faveyukis, S., Nguyen, A.-K., Reichart, D., Scott, P., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C., Neels, J., and Olefsky, J. (2007a). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry* 282, 35279-35292.
- Nguyen, M. T., Faveyukis, S., Nguyen, A. K., Reichart, D., Scott, P. A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C. K., Neels, J. G., and Olefsky, J. M. (2007b). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 282, 35279-35292.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., and Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336, 1262-1267.
- Nijhuis, J., Rensen, S. S., Slaats, Y., van Dielen, F. M., Buurman, W. A., and Greve, J. W. (2009). Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obesity (Silver Spring)* 17, 2014-2018.

- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., et al. (2009). CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15, 914-920.
- Nomiyama, T., Perez-Tilve, D., Ogawa, D., Gizard, F., Zhao, Y., Heywood, E. B., Jones, K. L., Kawamori, R., Cassis, L. A., Tschop, M. H., and Bruemmer, D. (2007). Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest* 117, 2877-2888.
- Nouaille, S., Blanquart, C., Zilberfarb, V., Boute, N., Perdereau, D., Roix, J., Burnol, A. F., and Issad, T. (2006). Interaction with Grb14 results in site-specific regulation of tyrosine phosphorylation of the insulin receptor. *EMBO Rep* 7, 512-518.
- Nunemaker, C. S., Chen, M., Pei, H., Kimble, S. D., Keller, S. R., Carter, J. D., Yang, Z., Smith, K. M., Wu, R., Bevard, M. H., et al. (2008). 12-Lipoxygenase-knockout mice are resistant to inflammatory effects of obesity induced by Western diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E1065-1075.
- O'Rahilly, S., and Farooqi, I. S. (2006). Genetics of obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 1095-1105.
- O'Rourke, R. W., Meyer, K. A., Neeley, C. K., Gaston, G. D., Sekhri, P., Szumowski, M., Zamarron, B., Lumeng, C. N., and Marks, D. L. (2014). Systemic NK cell ablation attenuates intra-abdominal adipose tissue macrophage infiltration in murine obesity. *Obesity (Silver Spring)* 22, 2109-2114.
- O'Rourke, R. W., White, A. E., Metcalf, M. D., Olivas, A. S., Mitra, P., Larison, W. G., Cheang, E. C., Varlamov, O., Corless, C. L., Roberts, C. T., Jr., and Marks, D. L. (2011). Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia* 54, 1480-1490.
- Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Goforth, M. H., Morel, C. R., Subramanian, V., Mukundan, L., Red Eagle, A., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A. W., and Chawla, A. (2007). Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447, 1116-1120.
- Ohara, R., Miyoshi, J., Aoki, M., and Toyoshima, K. (1993). The murine cot proto-oncogene: genome structure and tissue-specific expression. *Jpn J Cancer Res* 84, 518-525.
- Ohashi, K., Parker, J. L., Ouchi, N., Higuchi, A., Vita, J. A., Gokce, N., Pedersen, A. A., Kalthoff, C., Tullin, S., Sams, A., et al. (2010). Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J Biol Chem* 285, 6153-6160.
- Okada-Iwabu, M., Yamauchi, T., Iwabu, M., Honma, T., Hamagami, K., Matsuda, K., Yamaguchi, M., Tanabe, H., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., et al. (2013). A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 503, 493-499.
- Okorodudu, D. O., Jumean, M. F., Montori, V. M., Romero-Corral, A., Somers, V. K., Erwin, P. J., and Lopez-Jimenez, F. (2010). Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity: a systematic review and meta-analysis. *Int J Obes (Lond)* 34, 791-799.
- Orr, J., Puglisi, M., Ellacott, K., Lumeng, C., Wasserman, D., and Hasty, A. (2012). Toll-like Receptor 4 Deficiency Promotes the Alternative Activation of Adipose Tissue Macrophages. *Diabetes*.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L. H., and Hotamisligil, G. S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457-461.
- Padmalayam, I., and Suto, M. (2013). Role of adiponectin in the metabolic syndrome: current perspectives on its modulation as a treatment strategy. *Curr Pharm Des* 19, 5755-5763.
- Pandey, M., Loskutoff, D. J., and Samad, F. (2005). Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-alpha-mediated plasminogen activator inhibitor-1 expression in adipocytes. *Faseb J* 19, 1317-1319.

- Pang, C., Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Jia, W., and Ye, J. (2008). Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E313-322.
- Park, H. K., and Ahima, R. S. (2014). Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism*.
- Pasarica, M., Sereda, O. R., Redman, L. M., Albarado, D. C., Hymel, D. T., Roan, L. E., Rood, J. C., Burk, D. H., and Smith, S. R. (2009). Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes* 58, 718-725.
- Patriotis, C., Makris, A., Bear, S. E., and Tsichlis, P. N. (1993). Tumor progression locus 2 (Tpl-2) encodes a protein kinase involved in the progression of rodent T-cell lymphomas and in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2251-2255.
- Patsouris, D., Li, P. P., Thapar, D., Chapman, J., Olefsky, J. M., and Neels, J. G. (2008). Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab* 8, 301-309.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- Perfield, J. W., 2nd, Lee, Y., Shulman, G. I., Samuel, V. T., Jurczak, M. J., Chang, E., Xie, C., Tsichlis, P. N., Obin, M. S., and Greenberg, A. S. (2011). Tumor progression locus 2 (TPL2) regulates obesity-associated inflammation and insulin resistance. *Diabetes* 60, 1168-1176.
- Pernicova, I., and Korbonits, M. (2014). Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol* 10, 143-156.
- Pi-Sunyer, F. X. (2004). The epidemiology of central fat distribution in relation to disease. *Nutr Rev* 62, S120-126.
- Poggi, M., Bastelica, D., Gual, P., Iglesias, M., Gremeaux, T., Knauf, C., Peiretti, F., Verdier, M., Juhan-Vague, I., Tanti, J., et al. (2007). C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 50, 1267-1276.
- Poggi, M., Jager, J., Paulmyer-Lacroix, O., Peiretti, F., Gremeaux, T., Verdier, M., Grino, M., Stepanian, A., Msika, S., Burcelin, R., et al. (2009). The inflammatory receptor CD40 is expressed on human adipocytes: contribution to crosstalk between lymphocytes and adipocytes. *Diabetologia* 52, 1152-1163.
- Polyak, A., Ferenczi, S., Denes, A., Winkler, Z., Kriszt, R., Pinter-Kubler, B., and Kovacs, K. J. (2014). The fractalkine/Cx3CR1 system is implicated in the development of metabolic visceral adipose tissue inflammation in obesity. *Brain Behav Immun* 38, 25-35.
- Pomerantz, J. L., and Baltimore, D. (2002). Two pathways to NF-kappaB. *Mol Cell* 10, 693-695.
- Pouyssegur, J., and Lenormand, P. (2003). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur J Biochem* 270, 3291-3299.
- Prieur, X., Mok, C. Y., Velagapudi, V. R., Nunez, V., Fuentes, L., Montaner, D., Ishikawa, K., Camacho, A., Barbarroja, N., O'Rahilly, S., et al. (2011). Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes* 60, 797-809.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., and Davis, R. J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270, 7420-7426.

Rakhshandehroo, M., Kalkhoven, E., and Boes, M. (2013). Invariant natural killer T cells in adipose tissue: novel regulators of immune-mediated metabolic disease. *Cell Mol Life Sci* 70, 4711-4727.

Ramkhelawon, B., Hennessy, E. J., Menager, M., Ray, T. D., Sheedy, F. J., Hutchison, S., Wanschel, A., Oldebeken, S., Geoffrion, M., Spiro, W., et al. (2014). Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nat Med* 20, 377-384.

Ramkhelawon, B., Yang, Y., van Gils, J. M., Hewing, B., Rayner, K. J., Parathath, S., Guo, L., Oldebeken, S., Feig, J. L., Fisher, E. A., and Moore, K. J. (2013). Hypoxia induces netrin-1 and Unc5b in atherosclerotic plaques: mechanism for macrophage retention and survival. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 1180-1188.

Rausch, M. E., Weisberg, S., Vardhana, P., and Tortoriello, D. V. (2008). Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes (Lond)* 32, 451-463.

Regazzetti, C., Peraldi, P., Gremeaux, T., Najem-Lendom, R., Ben-Sahra, I., Cormont, M., Bost, F., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J. F., and Giorgetti-Peraldi, S. (2009). Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes* 58, 95-103.

Reid, J., Macdougall, A. I., and Andrews, M. M. (1957). Aspirin and diabetes mellitus. *Br Med J* 2, 1071-1074.
Ricciotti, E., and FitzGerald, G. A. (2010). Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 986-1000.

Ricquier, D. (2005). Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proc Nutr Soc* 64, 47-52.

Roberts, R., Hodson, L., Dennis, A. L., Neville, M. J., Humphreys, S. M., Harnden, K. E., Micklem, K. J., and Frayn, K. N. (2009). Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia* 52, 882-890.

Robinson, M. J., Beinke, S., Kouroumalis, A., Tschlis, P. N., and Ley, S. C. (2007). Phosphorylation of TPL-2 on serine 400 is essential for lipopolysaccharide activation of extracellular signal-regulated kinase in macrophages. *Mol Cell Biol* 27, 7355-7364.

Rodriguez, A., Duran, A., Selloum, M., Champy, M.-F., Diez-Guerra, F. J., Flores, J. M., Serrano, M., Auwerx, J., Diaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (2006). Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab* 3, 211-222.

Rohl, M., Pasparakis, M., Baudler, S., Baumgartl, J., Gautam, D., Huth, M., De Lorenzi, R., Krone, W., Rajewsky, K., and Bruning, J. C. (2004). Conditional disruption of I κ B kinase 2 fails to prevent obesity-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 113, 474-481.

Rotter, V., Nagaev, I., and Smith, U. (2003). Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- α , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 278, 45777-45784. Epub 42003 Sep 45772.

Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A. R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027-1037.

Rousseau, S., Papoutsopoulou, M., Symons, A., Cook, D., Lucocq, J. M., Prescott, A. R., O'Garra, A., Ley, S. C., and Cohen, P. (2008). TPL2-mediated activation of ERK1 and ERK2 regulates the processing of pre-TNF α in LPS-stimulated macrophages. *J Cell Sci* 121, 149-154.

Roux, P. P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 320-344.

- Rowley, S. M., Kuriakose, T., Dockery, L. M., Tran-Ngyuen, T., Gingerich, A. D., Wei, L., and Watford, W. T. (2014). Tumor progression locus 2 (Tpl2) kinase promotes chemokine receptor expression and macrophage migration during acute inflammation. *J Biol Chem* 289, 15788-15797.
- Ruan, H., and Lodish, H. F. (2004). Regulation of insulin sensitivity by adipose tissue-derived hormones and inflammatory cytokines. *Curr Opin Lipidol* 15, 297-302.
- Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., and White, M. F. (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 277, 42394-42398.
- Ryden, M., Arvidsson, E., Blomqvist, L., Perbeck, L., Dicker, A., and Arner, P. (2004). Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 168-175.
- Saberi, M., Woods, N. B., de Luca, C., Schenk, S., Lu, J. C., Bandyopadhyay, G., Verma, I. M., and Olefsky, J. M. (2009). Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. *Cell Metab* 10, 419-429.
- Sabio, G., Cavanagh-Kyros, J., Ko, H. J., Jung, D. Y., Gray, S., Jun, J. Y., Barrett, T., Mora, A., Kim, J. K., and Davis, R. J. (2009). Prevention of steatosis by hepatic JNK1. *Cell Metab* 10, 491-498.
- Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J. Y., Ko, H. J., Barrett, T., Kim, J. K., and Davis, R. J. (2008). A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 322, 1539-1543.
- Schertzer, J. D., Tamrakar, A. K., Magalhaes, J. G., Pereira, S., Bilan, P. J., Fullerton, M. D., Liu, Z., Steinberg, G. R., Giacca, A., Philpott, D. J., and Klip, A. (2011). NOD1 activators link innate immunity to insulin resistance. *Diabetes* 60, 2206-2215.
- Schmidt, A. M., and Moore, K. J. (2013). The Semaphorin 3E/PlexinD1 axis regulates macrophage inflammation in obesity. *Cell Metab* 18, 461-462.
- Schwenk, R. W., Vogel, H., and Schurmann, A. (2013). Genetic and epigenetic control of metabolic health. *Mol Metab* 2, 337-347.
- Seko, Y., Takahashi, N., Tobe, K., Kadowaki, T., and Yazaki, Y. (1997). Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate p65PAK, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and stress-activated protein kinase (SAPK) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 840-844.
- Serebrennikova, O. B., Tsatsanis, C., Mao, C., Gounaris, E., Ren, W., Siracusa, L. D., Eliopoulos, A. G., Khazaie, K., and Tschlis, P. N. (2012). Tpl2 ablation promotes intestinal inflammation and tumorigenesis in Apcmin mice by inhibiting IL-10 secretion and regulatory T-cell generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E1082-1091.
- Shaul, M. E., Bennett, G., Strissel, K. J., Greenberg, A. S., and Obin, M. S. (2010). Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet--induced obesity in mice. *Diabetes* 59, 1171-1181.
- Shen, Y. H., Zhang, L., Gan, Y., Wang, X., Wang, J., LeMaire, S. A., Coselli, J. S., and Wang, X. L. (2006). Up-regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) mediates p38 MAPK stress signal-induced inhibition of insulin signaling. A cross-talk between stress signaling and insulin signaling in resistin-treated human endothelial cells. *J Biol Chem* 281, 7727-7736.
- Shepherd, P. R. (2005). Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand* 183, 3-12.
- Shi, H., Kokoeva, M., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., and Flier, J. (2006a). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 116, 3015-3025.

- Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., and Flier, J. S. (2006b). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116, 3015-3025.
- Shimizu, I., Yoshida, Y., Moriya, J., Nojima, A., Uemura, A., Kobayashi, Y., and Minamino, T. (2013). Semaphorin3E-induced inflammation contributes to insulin resistance in dietary obesity. *Cell Metab* 18, 491-504.
- Soehnlein, O., Zernecke, A., Eriksson, E. E., Rothfuchs, A. G., Pham, C. T., Herwald, H., Bidzhekov, K., Rottenberg, M. E., Weber, C., and Lindbom, L. (2008). Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* 112, 1461-1471.
- Solinas, G., Vilcu, C., Neels, J. G., Bandyopadhyay, G. K., Luo, J. L., Naugler, W., Grivennikov, S., Wynshaw-Boris, A., Scadeng, M., Olefsky, J. M., and Karin, M. (2007). JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab* 6, 386-397.
- Solt, L. A., and May, M. J. (2008). The I κ B kinase complex: master regulator of NF- κ B signaling. *Immunol Res* 42, 3-18.
- Soond, S. M., Everson, B., Riches, D. W., and Murphy, G. (2005). ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF α -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci* 118, 2371-2380.
- Souza, S. C., Palmer, H. J., Kang, Y. H., Yamamoto, M. T., Muliro, K. V., Paulson, K. E., and Greenberg, A. S. (2003). TNF- α induction of lipolysis is mediated through activation of the extracellular signal related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem* 89, 1077-1086.
- Spada, F. M., Borriello, F., Sugita, M., Watts, G. F., Koezuka, Y., and Porcelli, S. A. (2000). Low expression level but potent antigen presenting function of CD1d on monocyte lineage cells. *Eur J Immunol* 30, 3468-3477.
- Spencer, L. A., and Weller, P. F. (2010). Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol Cell Biol* 88, 250-256.
- Spite, M., Hellmann, J., Tang, Y., Mathis, S. P., Kosuri, M., Bhatnagar, A., Jala, V. R., and Haribabu, B. (2011). Deficiency of the leukotriene B4 receptor, BLT-1, protects against systemic insulin resistance in diet-induced obesity. *J Immunol* 187, 1942-1949.
- Stafford, M. J., Morrice, N. A., Pegg, M. W., and Cohen, P. (2006). Interleukin-1 stimulated activation of the COT catalytic subunit through the phosphorylation of Thr290 and Ser62. *FEBS Lett* 580, 4010-4014.
- Stefanovic-Racic, M., Yang, X., Turner, M. S., Mantell, B. S., Stolz, D. B., Sumpter, T. L., Sipula, I. J., Dedousis, N., Scott, D. K., Morel, P. A., et al. (2012). Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c⁺ cells in adipose tissue and liver. *Diabetes* 61, 2330-2339.
- Stienstra, R., Duval, C., Keshtkar, S., van der Laak, J., Kersten, S., and Muller, M. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation promotes infiltration of alternatively activated macrophages into adipose tissue. *J Biol Chem* 283, 22620-22627.
- Stienstra, R., Joosten, L. A., Koenen, T., van Tits, B., van Diepen, J. A., van den Berg, S. A., Rensen, P. C., Voshol, P. J., Fantuzzi, G., Hijmans, A., et al. (2010). The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab* 12, 593-605.
- Stienstra, R., van Diepen, J. A., Tack, C. J., Zaki, M. H., van de Veerdonk, F. L., Perera, D., Neale, G. A., Hooiveld, G. J., Hijmans, A., Vroegrijk, I., et al. (2011). Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 15324-15329.
- Suga, H., Eto, H., Aoi, N., Kato, H., Araki, J., Doi, K., Higashino, T., and Yoshimura, K. (2010). Adipose tissue remodeling under ischemia: death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells. *Plast Reconstr Surg* 126, 1911-1923.

Suganami, T., Mieda, T., Itoh, M., Shimoda, Y., Kamei, Y., and Ogawa, Y. (2007a). Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochemical and biophysical research communications* 354, 45-49.

Suganami, T., Nishida, J., and Ogawa, Y. (2005). A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 2062-2068.

Suganami, T., Tanimoto-Koyama, K., Nishida, J., Itoh, M., Yuan, X., Mizuarai, S., Kotani, H., Yamaoka, S., Miyake, K., Aoe, S., et al. (2007b). Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 84-91.

Sugimoto, K., Ohata, M., Miyoshi, J., Ishizaki, H., Tsuboi, N., Masuda, A., Yoshikai, Y., Takamoto, M., Sugane, K., Matsuo, S., et al. (2004). A serine/threonine kinase, Cot/Tpl2, modulates bacterial DNA-induced IL-12 production and Th cell differentiation. *J Clin Invest* 114, 857-866.

Sullivan, T. J., Miao, Z., Zhao, B. N., Ertl, L. S., Wang, Y., Krasinski, A., Walters, M. J., Powers, J. P., Dairaghi, D. J., Baumgart, T., et al. (2013). Experimental evidence for the use of CCR2 antagonists in the treatment of type 2 diabetes. *Metabolism* 62, 1623-1632.

Sun, K., Tordjman, J., Clement, K., and Scherer, P. E. (2013). Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab* 18, 470-477.

Surmi, B. K., Webb, C. D., Ristau, A. C., and Hasty, A. H. (2010). Absence of macrophage inflammatory protein-1{alpha} does not impact macrophage accumulation in adipose tissue of diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299, E437-445.

Symons, A., Beinke, S., and Ley, S. C. (2006). MAP kinase kinase kinases and innate immunity. *Trends Immunol* 27, 40-48.

Tagami S., Inokuchi Ji J., Kabayama K., Yoshimura H., Kitamura F., Uemura S., Ogawa C., Ishii A., Saito M., Ohtsuka Y., Sakaue S., Igarashi Y. (2002) Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J Biol Chem* 277, 3085-92.

Tajima, T., Murata, T., Aritake, K., Urade, Y., Hirai, H., Nakamura, M., Ozaki, H., and Hori, M. (2008). Lipopolysaccharide induces macrophage migration via prostaglandin D(2) and prostaglandin E(2). *J Pharmacol Exp Ther* 326, 493-501.

Takahashi, K., Yamaguchi, S., Shimoyama, T., Seki, H., Miyokawa, K., Katsuta, H., Tanaka, T., Yoshimoto, K., Ohno, H., Nagamatsu, S., and Ishida, H. (2008). JNK- and IkappaB-dependent pathways regulate MCP-1 but not adiponectin release from artificially hypertrophied 3T3-L1 adipocytes preloaded with palmitate in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294, E898-909.

Takano, A., Usui, I., Haruta, T., Kawahara, J., Uno, T., Iwata, M., and Kobayashi, M. (2001). Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin. *Mol Cell Biol* 21, 5050-5062.

Talukdar, S., Oh da, Y., Bandyopadhyay, G., Li, D., Xu, J., McNelis, J., Lu, M., Li, P., Yan, Q., Zhu, Y., et al. (2012). Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med* 18, 1407-1412.

Tamrakar, A. K., Schertzer, J. D., Chiu, T. T., Foley, K. P., Bilan, P. J., Philpott, D. J., and Klip, A. (2010). NOD2 activation induces muscle cell-autonomous innate immune responses and insulin resistance. *Endocrinology* 151, 5624-5637.

- Tamura, Y., Sugimoto, M., Murayama, T., Minami, M., Nishikaze, Y., Ariyasu, H., Akamizu, T., Kita, T., Yokode, M., and Arai, H. (2010). C-C chemokine receptor 2 inhibitor improves diet-induced development of insulin resistance and hepatic steatosis in mice. *J Atheroscler Thromb* 17, 219-228.
- Tamura, Y., Sugimoto, M., Murayama, T., Ueda, Y., Kanamori, H., Ono, K., Ariyasu, H., Akamizu, T., Kita, T., Yokode, M., and Arai, H. (2008). Inhibition of CCR2 ameliorates insulin resistance and hepatic steatosis in db/db mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 2195-2201.
- Tanaka, A., Nomura, Y., Matsuda, A., Ohmori, K., and Matsuda, H. (2011). Mast cells function as an alternative modulator of adipogenesis through 15-deoxy-delta-12, 14-prostaglandin J2. *Am J Physiol Cell Physiol* 301, C1360-1367.
- Tanti, J. F., Ceppo, F., Jager, J., and Berthou, F. (2013). Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 181.
- Tanti, J. F., Gremeaux, T., van Obberghen, E., and Le Marchand-Brustel, Y. (1994). Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *J Biol Chem* 269, 6051-6057.
- Tanti, J. F., and Jager, J. (2009). Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol* 9, 753-762.
- Teixeira, T. F., Collado, M. C., Ferreira, C. L., Bressan, J., and Peluzio Mdo, C. (2012). Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. *Nutr Res* 32, 637-647.
- Teng, X., Li, D., Catravas, J. D., and Johns, R. A. (2002). C/EBP-beta mediates iNOS induction by hypoxia in rat pulmonary microvascular smooth muscle cells. *Circ Res* 90, 125-127.
- Thorens, B., and Mueckler, M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E141-145.
- Tomkin, G. H. (2014). Treatment of type 2 diabetes, lifestyle, GLP1 agonists and DPP4 inhibitors. *World J Diabetes* 5, 636-650.
- Trayhurn, P. (2013). Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev* 93, 1-21.
- Trayhurn, P., Wang, B., and Wood, I. S. (2008). Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr* 100, 227-235.
- Trayhurn, P., and Wood, I. S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92, 347-355.
- Trujillo, M. E., Lee, M. J., Sullivan, S., Feng, J., Schneider, S. H., Greenberg, A. S., and Fried, S. K. (2006). Tumor necrosis factor alpha and glucocorticoid synergistically increase leptin production in human adipose tissue: role for p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 1484-1490.
- Tseng, C. H. (2014). A review on thiazolidinediones and bladder cancer in human studies. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 32, 1-45.
- Tsukumo, D., Carvalho-Filho, M., Carvalheira, J., Prada, P. c., Hirabara, S., Schenka, A., Araújo, E., Vassallo, J., Curi, R., Velloso, L. c., and Saad, M. (2007). Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1986-1998.
- Tuncman, G., Hirosumi, J., Solinas, G., Chang, L., Karin, M., and Hotamisligil, G. S. (2006). Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10741-10746.

- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., and Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031.
- Vague, J. (1956). The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr* 4, 20-34.
- Vallerie, S. N., Furuhashi, M., Fucho, R., and Hotamisligil, G. S. (2008). A predominant role for parenchymal c-Jun amino terminal kinase (JNK) in the regulation of systemic insulin sensitivity. *PLoS ONE* 3, e3151.
- Van Acker, G. J., Perides, G., Weiss, E. R., Das, S., Tschlis, P. N., and Steer, M. L. (2007). Tumor progression locus-2 is a critical regulator of pancreatic and lung inflammation during acute pancreatitis. *J Biol Chem* 282, 22140-22149.
- Van de Laar, F. A., Lucassen, P. L., Akkermans, R. P., Van de Lisdonk, E. H., Rutten, G. E., and Van Weel, C. (2005). Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003639.
- Vandanmagsar, B., Youm, Y. H., Ravussin, A., Galgani, J. E., Stadler, K., Mynatt, R. L., Ravussin, E., Stephens, J. M., and Dixit, V. D. (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 17, 179-188.
- Vaxillaire, M., Bonnefond, A., and Froguel, P. (2012). The lessons of early-onset monogenic diabetes for the understanding of diabetes pathogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26, 171-187.
- Vieira-Potter, V. J. (2014). Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. *Cell Microbiol* 16, 1484-1492.
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J., Carvalho, F., Cullender, T., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S., Knight, R., Ley, R., and Gewirtz, A. (2010). Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science (New York, NY)* 328, 228-231.
- Villaret, A., Galitzky, J., Decaunes, P., Esteve, D., Marques, M. A., Sengenès, C., Chiotasso, P., Tchkonja, T., Lafontan, M., Kirkland, J. L., and Bouloumie, A. (2010). Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence. *Diabetes* 59, 2755-2763.
- Virtue, S., and Vidal-Puig, A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 1801, 338-349.
- Vosseller, K., Wells, L., Lane, M. D., and Hart, G. W. (2002). Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5313-5318.
- Waeber, G., Delplanque, J., Bonny, C., Mooser, V., Steinmann, M., Widmann, C., Maillard, A., Miklossy, J., Dina, C., Hani, E. H., et al. (2000). The gene MAPK8IP1, encoding islet-brain-1, is a candidate for type 2 diabetes. *Nat Genet* 24, 291-295.
- Waetzig, V., and Herdegen, T. (2005). Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol Sci* 26, 455-461.
- Wang, H., and Eckel, R. H. (2009). Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E271-288.
- Waterfield, M., Jin, W., Reiley, W., Zhang, M., and Sun, S. C. (2004). IkappaB kinase is an essential component of the Tpl2 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 24, 6040-6048.
- Watford, W. T., Hissong, B. D., Durant, L. R., Yamane, H., Muul, L. M., Kanno, Y., Tato, C. M., Ramos, H. L., Berger, A. E., Mielke, L., et al. (2008). Tpl2 kinase regulates T cell interferon-gamma production and host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 205, 2803-2812.

- Watt, M. J., Hevener, A., Lancaster, G. I., and Febbraio, M. A. (2006). Ciliary neurotrophic factor prevents acute lipid-induced insulin resistance by attenuating ceramide accumulation and phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase in peripheral tissues. *Endocrinology* 147, 2077-2085.
- Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W., Jr. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116, 115-124.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808.
- Wellen, K. E., Fucho, R., Gregor, M. F., Furuhashi, M., Morgan, C., Lindstad, T., Vaillancourt, E., Gorgun, C. Z., Saatcioglu, F., and Hotamisligil, G. S. (2007). Coordinated regulation of nutrient and inflammatory responses by STAMP2 is essential for metabolic homeostasis. *Cell* 129, 537-548.
- Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M. T., Brickey, W. J., and Ting, J. P. (2011). Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol* 12, 408-415.
- White, W. O., Seibenhener, M. L., and Wooten, M. W. (2002). Phosphorylation of tyrosine 256 facilitates nuclear import of atypical protein kinase C. *J Cell Biochem* 85, 42-53.
- Wiesener, M. S., Turley, H., Allen, W. E., Willam, C., Eckardt, K. U., Talks, K. L., Wood, S. M., Gatter, K. C., Harris, A. L., Pugh, C. W., et al. (1998). Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* 92, 2260-2268.
- Wilden, P. A., Kahn, C. R., Siddle, K., and White, M. F. (1992). Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. *J Biol Chem* 267, 16660-16668.
- Williamson, R. (1901). On the treatment of glycosuria and diabets mellitus with sodium salicylate. *Br Med J* 1, 760-762.
- Winer, D. A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P. P., Yantha, J., Paltser, G., Tsui, H., Wu, P., Davidson, M. G., Alonso, M. N., et al. (2011). B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med* 17, 610-617.
- Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., Bahrami, J., Dorfman, R., Wang, Y., Zielenski, J., Mastronardi, F., et al. (2009). Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 15, 921-929.
- Witczak, C. A., Hirshman, M. F., Jessen, N., Fujii, N., Seifert, M. M., Brandauer, J., Hotamisligil, G. S., and Goodyear, L. J. (2006). JNK1 deficiency does not enhance muscle glucose metabolism in lean mice. *Biochem Biophys Res Commun* 350, 1063-1068.
- Wu, D., Molofsky, A. B., Liang, H. E., Ricardo-Gonzalez, R. R., Jouihan, H. A., Bando, J. K., Chawla, A., and Locksley, R. M. (2011). Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 332, 243-247.
- Wu, H., Ghosh, S., Perrard, X. D., Feng, L., Garcia, G. E., Perrard, J. L., Sweeney, J. F., Peterson, L. E., Chan, L., Smith, C. W., and Ballantyne, C. M. (2007). T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation* 115, 1029-1038.
- Wu, L., and Liu, Y. J. (2007). Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 26, 741-750.
- Wunderlich, F. T., Luedde, T., Singer, S., Schmidt-Supprian, M., Baumgartl, J., Schirmacher, P., Pasparakis, M., and Bruning, J. C. (2008). Hepatic NF-kappa B essential modulator deficiency prevents obesity-induced insulin resistance but synergizes with high-fat feeding in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1297-1302.

Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., and Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112, 1821-1830.

Xu, J. M., and Shi, G. P. (2012). Emerging role of mast cells and macrophages in cardiovascular and metabolic diseases. *Endocr Rev* 33, 71-108.

Xu, X., Grijalva, A., Skowronski, A., van Eijk, M., Serlie, M. J., and Ferrante, A. W., Jr. (2013). Obesity activates a program of lysosomal-dependent lipid metabolism in adipose tissue macrophages independently of classic activation. *Cell Metab* 18, 816-830.

Xu, X., Sarikas, A., Dias-Santagata, D. C., Dolios, G., Lafontant, P. J., Tsai, S. C., Zhu, W., Nakajima, H., Nakajima, H. O., Field, L. J., et al. (2008). The CUL7 E3 ubiquitin ligase targets insulin receptor substrate 1 for ubiquitin-dependent degradation. *Mol Cell* 30, 403-414.

Xueyao, Y., Saifei, Z., Dan, Y., Qianqian, P., Xuehong, D., Jiaqiang, Z., Fenping, Z., and Hong, L. (2014). Circulating fractalkine levels predict the development of the metabolic syndrome. *Int J Endocrinol* 2014, 715148.

Yang, H., Youm, Y. H., Vandanmagsar, B., Ravussin, A., Gimble, J. M., Greenway, F., Stephens, J. M., Mynatt, R. L., and Dixit, V. D. (2010). Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J Immunol* 185, 1836-1845.

Yang, R., and Trevillyan, J. M. (2008). c-Jun N-terminal kinase pathways in diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 2702-2706.

Yaomura, T., Tsuboi, N., Urahama, Y., Hobo, A., Sugimoto, K., Miyoshi, J., Matsuguchi, T., Reiji, K., Matsuo, S., and Yuzawa, Y. (2008). Serine/threonine kinase, Cot/Tpl2, regulates renal cell apoptosis in ischaemia/reperfusion injury. *Nephrology (Carlton)* 13, 397-404.

Yau, H., Rivera, K., Lomonaco, R., and Cusi, K. (2013). The future of thiazolidinedione therapy in the management of type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 13, 329-341.

Ye, J. (2009). Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 33, 54-66.

Ye, J., Gao, Z., Yin, J., and He, Q. (2007). Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E1118-1128.

Yenush, L., Makati, K. J., Smith-Hall, J., Ishibashi, O., Myers, M. G., Jr., and White, M. F. (1996). The pleckstrin homology domain is the principal link between the insulin receptor and IRS-1. *J Biol Chem* 271, 24300-24306.

Youngren, J. F. (2007). Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 64, 873-891.

Yu, R., Kim, C. S., Kwon, B. S., and Kawada, T. (2006). Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice. *Obesity (Silver Spring)* 14, 1353-1362.

Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z. W., Karin, M., and Shoelson, S. E. (2001). Reversal of Obesity- and Diet-Induced Insulin Resistance with Salicylates or Targeted Disruption of Ikkbeta. *Science* 293, 1673-1677.

Zabolotny, J. M., Kim, Y. B., Welsh, L. A., Kershaw, E. E., Neel, B. G., and Kahn, B. B. (2008). Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem* 283, 14230-14241.

- Zaragosi, L. E., Wdziekonski, B., Villageois, P., Keophiphath, M., Maumus, M., Tchkonja, T., Bourlier, V., Mohsen-Kanson, T., Ladoux, A., Elabd, C., et al. (2010). Activin a plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes* 59, 2513-2521.
- Zeyda, M., Farmer, D., Todoric, J., Aszmann, O., Speiser, M., Gyori, G., Zlabinger, G. J., and Stulnig, T. M. (2007). Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes (Lond)* 31, 1420-1428.
- Zeyda, M., Gollinger, K., Todoric, J., Kiefer, F. W., Keck, M., Aszmann, O., Prager, G., Zlabinger, G. J., Petzelbauer, P., and Stulnig, T. M. (2011). Osteopontin is an activator of human adipose tissue macrophages and directly affects adipocyte function. *Endocrinology* 152, 2219-2227.
- Zhang, H. H., Halbleib, M., Ahmad, F., Manganiello, V. C., and Greenberg, A. S. (2002). Tumor necrosis factor- α stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* 51, 2929-2935.
- Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., and Cai, D. (2008). Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135, 61-73.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhao, H., Serby, M. D., Xin, Z., Szczepankiewicz, B. G., Liu, M., Kosogof, C., Liu, B., Nelson, L. T., Johnson, E. F., Wang, S., et al. (2006). Discovery of potent, highly selective, and orally bioavailable pyridine carboxamide c-Jun NH2-terminal kinase inhibitors. *J Med Chem* 49, 4455-4458.
- Zick, Y. (2003). Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27, S56-60.
- Zimmer, P., Alberti, K. G., and Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787.
- Zlotnik, A., Yoshie, O., and Nishiyama, H. (2006). The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* 7, 243.
- Zuniga, L. A., Shen, W. J., Joyce-Shaikh, B., Pyatnova, E. A., Richards, A. G., Thom, C., Andrade, S. M., Cua, D. J., Kraemer, F. B., and Butcher, E. C. (2010). IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J Immunol* 185, 6947-6959.

ANNEXES

CORRECTION

Rab4b controls an early endosome sorting event by interacting with the γ -subunit of the clathrin adaptor complex 1

Laura Perrin, Sandra Lacas-Gervais, Jérôme Gilleron, Franck Ceppo, François Prodon, Alexandre Benmerah, Jean-François Tanti and Mireille Cormont

There was an error published in *J. Cell Sci.* **126**, 4950–4962.

All author names were transposed and indexed under first names. The correct author list is as shown above.

We apologise to the authors and readers for any confusion that this error might have caused.

Rab4b controls an early endosome sorting event by interacting with the γ -subunit of the clathrin adaptor complex 1

Perrin Laura^{1,2,*}, Lacas-Gervais Sandra³, Gilleron Jérôme^{1,2}, Ceppo Franck^{1,2}, Prodon François^{1,2,†}, Benmerah Alexandre^{4,5}, Tanti Jean-François^{1,2} and Cormont Mireille^{1,2,§}

¹INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire C3M, Nice, France

²Université de Nice Sophia-Antipolis, Nice, France

³Université de Nice Sophia-Antipolis, Centre Commun de Microscopie Appliquée CCCMA, Nice, France

⁴INSERM U983, Institut Cochin, Paris, France

⁵Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Paris, France

*Present address: CENBG, Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan, CNRS UMR5797, Université Bordeaux 1, Gradignan, France

†Present address: Université de Genève, Bioimaging team, Genève, Switzerland

§Author for correspondence (cormont@unice.fr)

Accepted 8 August 2013

Journal of Cell Science 126, 4950–4962

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd

doi: 10.1242/jcs.130575

Summary

The endocytic pathway is essential for cell homeostasis and numerous small Rab GTPases are involved in its control. The endocytic trafficking step controlled by Rab4b has not been elucidated, although recent data suggested it could be important for glucose homeostasis, synaptic homeostasis or adaptive immunity. Here, we show that Rab4b is required for early endosome sorting of transferrin receptors (TfRs) to the recycling endosomes, and we identified the AP1 γ subunit of the clathrin adaptor AP-1 as a Rab4b effector and key component of the machinery of early endosome sorting. We show that internalised transferrin (Tf) does not reach Vamp3/Rab11 recycling endosomes in the absence of Rab4b, whereas it is rapidly recycled back to the plasma membrane. By contrast, overexpression of Rab4b leads to the accumulation of internalised Tf within AP-1- and clathrin-coated vesicles. These vesicles are poor in early and recycling endocytic markers except for TfR and require AP1 γ for their formation. Furthermore, the targeted overexpression of the Rab4b-binding domain of AP1 γ to early endosome upon its fusion with FYVE domains inhibited the interaction between Rab4b and endogenous AP1 γ , and perturbed Tf traffic. We thus proposed that the interaction between early endocytic Rab4b and AP1 γ could allow the budding of clathrin-coated vesicles for subsequent traffic to recycling endosomes. The data also uncover a novel type of endosomes, characterised by low abundance of either early or recycling endocytic markers, which could potentially be generated in cell types that naturally express high level of Rab4b.

Key words: Rab, Rab4b effector, Endocytic recycling

Introduction

The GTPase Rab4b is phylogenetically conserved from yeast *Schizosaccharomyces pombe* (Ypt4) to metazoans. The Rab4a orthologous gene is present in Zebrafish and was conserved during evolution through metazoans. Rab4b and Rab4a are encoded by two genes. The Rab proteins were classified according to phylogenetic trees in eight groups, and Rab4b is in a group also containing Rab2 (a and b), Rab4a, Rab11 (a and b) and Rab14 (Pereira-Leal and Seabra, 2001), which widely overlaps with a route of membrane traffic corresponding to recycling from endosomes to the cell surface (Stenmark, 2012). Large-scale profiling of Rab trafficking networks strongly suggests that Rab4b and Rab4a can fulfil different biological functions (Gurkan et al., 2005). This could be mainly due to differences in their respective enrichment, alongside that of their multiple partners in each cell type.

Of the Rab4 GTPases, Rab4a has been the most extensively studied, probably because it was discovered first. Its role is, however, not completely understood (reviewed by Grant and Donaldson, 2009), although it seems clear that it is associated

with the early/recycling endocytic system (Sönnichsen et al., 2000). The early/recycling endocytic system is used by numerous molecules, including the transferrin receptors (TfRs), the prototype receptor for this pathway (Maxfield and McGraw, 2004). TfR enters cells by clathrin-dependent endocytosis. It is then delivered to early endosomes from which it can be sorted to the plasma membrane (fast recycling) or to the recycling endosomes. Recycling endosomes have a heterogeneous tubular-vesicular morphology and are defined by their accessibility for extracellular Tf and enrichment in markers such as Rab11 or Vamp3, and by the loss of early endosomal markers (EEA1, Rab5). TfR is also recycled from recycling endosomes back to the plasma membrane and this is referred to as the slow recycling pathway (Grant and Donaldson, 2009; Maxfield and McGraw, 2004). Overexpression of Rab4a favours Tf recycling from early endosomes, leading to an increased amount of TfR at the plasma membrane (McCaffrey et al., 2001; van der Sluijs et al., 1992). By contrast, the overexpression of inactive forms of Rab4a (Cormont et al., 2003; McCaffrey et al., 2001) and the overexpression of TBC1D16, a Rab4a GAP

(Goueli et al., 2012), inhibits TfR recycling. However, shRNA-mediated knockdown of Rab4a increases TfR fast recycling (Deneka et al., 2003). Numerous Rab4a effectors have been identified already. The overexpression of some of them, such as Rabip4 or D-AKAP2 induces a mixing of early and recycling endosomes, and decreases endosomal recycling and an inhibition of Tf recycling (Cormont et al., 2001; Eggers et al., 2009). The neuronal-specific Rab4a effector GRASP-1 also connects early and recycling endosomes (Hoogenraad et al., 2010). By contrast, overexpression of NDRG1 increases Tf recycling, whereas its downregulation inhibits Tf recycling (Kachhap et al., 2007). It is thus difficult to conclude on the exact role of Rab4a in endosomal trafficking, especially as all the studies were not performed on the same cells and also because the specificity of the Rab4a effectors for Rab4b has not been tested.

Only a small number of studies on Rab4b have been reported until now, and the trafficking step it controls has not been identified. In B lymphocytes, Rab4b expression is controlled in parallel with that of the major histocompatibility complex (MHC) class II, suggesting an important role in MHC-mediated antigen presentation (Krawczyk et al., 2007). Rab4b is a synapse-related gene that is affected in major depressive disorders in which synapses are lost in the dorsolateral prefrontal cortex (Kang et al., 2012). It could thus contribute to normal synapse genesis or function in this brain region. We found that, in adipocytes, Rab4b was partially colocalised with TfR (Kaddai et al., 2009), thus indicating that Rab4b is also an endocytic Rab. Its colocalisation with the Glut4 glucose transporters is greater than with TfR and the consequences of the downregulation of Rab4b in adipocytes strongly suggest its involvement in the control of Glut4 recycling between endosomes and their sequestration compartments (Kaddai et al., 2009): a role recently confirmed by Chen and co-workers (Chen et al., 2012). Because Rab4b is not only expressed in adipocytes, we set out to determine which endocytic trafficking steps it controls by studying TfR endocytic trafficking in HeLa cells expressing different levels of Rab4b.

Here, we establish a role for Rab4b in TfR trafficking between early and recycling endosomes in HeLa cells. Furthermore, we demonstrate that Rab4b interacts with the gamma subunit of the clathrin adaptor complex AP-1 (AP1 γ). AP-1 is a heterotetrameric complex composed of two \sim 100 kDa subunits (γ and β 1), a \sim 47 kDa subunit (μ 1), and a \sim 20 kDa subunit (σ 1). Two subunits, μ 1A and μ 1B exist and form the AP-1A and AP-1B adaptor complexes, respectively; the latter being exclusively expressed in epithelial cells. The hinge regions of γ - and β 1-subunits bind clathrin and the appendage of the γ -subunit binds several accessory proteins. The μ 1-subunits interact with tyrosine-based sorting motifs present on cargoes, and either they or the β 1 subunit bind the dileucine-base motif (Bonifacino and Traub, 2003). We also found that Rab4b and AP1 γ colocalise on clathrin-coated vesicles and TfR recycling is perturbed when Rab4b–AP1 γ interaction is experimentally affected. Taken together, our results indicate that Rab4b and AP1 γ cooperate for TfR trafficking.

Results

Rab4b controls the recycling of TfRs

To determine whether Rab4b participates in TfR recycling, we looked at the localisation of the two proteins. We used a cell line that expresses the murine form of Rab4b as a C-terminal fusion with GFP because no specific antibodies for Rab4b were available

for immunofluorescence experiments. The overexpression of GFP-Rab4b was modest with a two- to threefold enrichment compared with the endogenous protein (supplementary material Fig. S1A). GFP-Rab4b and TfR were mostly colocalised in a perinuclear region and in peripheral structures (Fig. 1A). Colocalisation was detected in each confocal section. The 3D reconstructions of the GFP-Rab4b and TfR labelling were mostly superimposable (Fig. 1B). Immunogold labelling in electron microscopy indicated that GFP-Rab4b and TfR can be found on a continuous membrane in the same tubulo-vesicular structures that were in the close vicinity of a vacuolar early endosomes (Fig. 1C). GFP-Rab4b colocalised with Myc-Rab4a in a perinuclear region, but not in the periphery of the cell (Fig. 1D). A partial colocalisation between endogenous Rabip4 (Cormont et al., 2001), a Rab4a effector, as well as expressed DsRed-Rabip4 (supplementary material Fig. S1B,C) was also observed in a perinuclear region. The high degree of colocalisation between Rab4b and TfR suggests that it could be involved in TfR recycling. Its restricted colocalisation with Rab4a and its effector Rabip4 suggests that Rab4b could have a role that is different from Rab4a in TfR recycling.

Thus, we quantified the steady-state distribution of TfR in cells with modified levels of Rab4b expression (overexpressed and downregulated). To this aim, we used wild-type HeLa cells (wt) and HeLa cells stably expressing the murine form of Rab4b fused with N-terminal HA-tag (Ha-Rab4b). The two cell lines were further transfected with a siRNA directed against human Rab4b. The siRNA efficiently downregulated the expression of endogenous Rab4b mRNA without affecting the expression of Rab4a mRNA. It downregulated the expression of endogenous Rab4b, but not the expression of the exogenous murine HA-Rab4b (Fig. 2A). In addition, the expression of TfR was identical in the two cell lines treated or not with siRNA to knock down Rab4b (Fig. 2B). Its amount at the cell surface was, however, modified by changes in Rab4b expression. Indeed, Rab4b silencing in wt HeLa cells increased cell surface levels of the TfR, as attested by an increase in Tf binding at the plasma membrane. Conversely, Rab4b overexpression decreased cell surface levels of the TfR. Importantly, siRNA against Rab4b had no significant effect in cells expressing Ha-Rab4b (Fig. 2C), confirming that the observed effect was due to silencing of Rab4b. Similar results were obtained when HeLa cells expressing murine GFP-Rab4b were used (data not shown). In accordance with this change in steady state distribution of TfR, the distribution of TfR-containing vesicles on a glycerol gradient was affected by either an increased or decreased expression of Rab4b (supplementary material Fig. S2).

The increase in cell surface TfRs could result either from an inhibition of their internalisation or an increase in recycling. We thus measured the amount of internalised Tf in the same experimental conditions as before. HeLa cells (wt or expressing HA-Rab4b treated or not with anti-Rab4b siRNA) were incubated for increasing periods of time with labelled Tf and the intracellular amount was quantified at the end of the incubation. We observed that Tf uptake was proportional to the amount of cell surface TfR in each experimental condition, strongly suggesting that internalisation was not affected (Fig. 2D). This was confirmed by measuring the initial rate of internalisation (Fig. 2E). Labelled Tf was first incubated at 4°C to allow its binding on cell surface TfRs. Its internalisation was then triggered by shifting the cells to 37°C. During the first minute, the

amount of intracellular Tf reached the same levels in cells expressing or not Rab4b, indicating that Rab4b does not play a role in Tf internalisation process. After 10 minutes of chase, the

intracellular amount of Tf was more efficiently decreased in cells depleted for Rab4b than in control cells (Fig. 2E). In the absence of Rab4b, Tf is thus rapidly targeted back to the plasma membrane. This suggests that recycling could occur from early compartments of the endocytic process. We next measured the recycling from early endosomes by imaging-based techniques to quantify internalised fluorescent Tf. Fluorescent Tf was incubated at 20°C, a temperature that blocks Tf trafficking at the level of early endosomes (Mallard et al., 1998) and recycling was initiated by shifting the cells to 37°C. We observed that Tf recycling was slower in HeLa cells expressing GFP-Rab4b compared with the wt, whereas it was accelerated by Rab4b silencing in wt HeLa cells (supplementary material Fig. S3).

Rab4b is involved in an early endosome sorting event required for Tf to reach recycling endosomes

Tf is thought to recycle to the plasma membrane through a fast (from early endosomes) and a slow (from recycling endosomes) recycling pathway (for reviews, see Grant and Donaldson, 2009; Maxfield and McGraw, 2004). Thus, our results strongly suggest that Rab4b is involved in the control of the balance between these two pathways. We hypothesised that Rab4b could play a role in TfR sorting between early and recycling endosomes. Indeed, extracellular Tf reached GFP-Rab4b compartments and some of the GFP-Rab4b-containing structures were decorated with the early endocytic marker EEA1 (supplementary material Fig. S4A, arrows) whereas others, mostly located in the cell periphery, were not (supplementary material Fig. S4A, arrowheads). Extracellular Tf pre-bound to its receptor at 4°C first reached EEA1-positive vesicles and thereafter the GFP-Rab4b compartments when the temperature was shifted to 37°C (supplementary material Fig. S4B). We next tested whether extracellular Tf could reach recycling endosomes in the absence of Rab4b. To this aim, HeLa cells were transfected with Myc-Rab11 to label the recycling endosomes together with control or anti-Rab4b siRNA, and cells were incubated for 90 minutes with fluorescent Tf allowing it to equilibrate within its intracellular compartments (Fig. 3A). In control conditions, and as expected, extracellular Tf was detected in early endosomes (labelled with anti-EEA1 antibodies) and in recycling endosomes (labelled with exogenous Rab11). The most intense peaks of internalised Tf were colocalised with Myc-Rab11. In the absence of Rab4b, the most intense peaks of internalised Tf were found either with EEA1, or without both

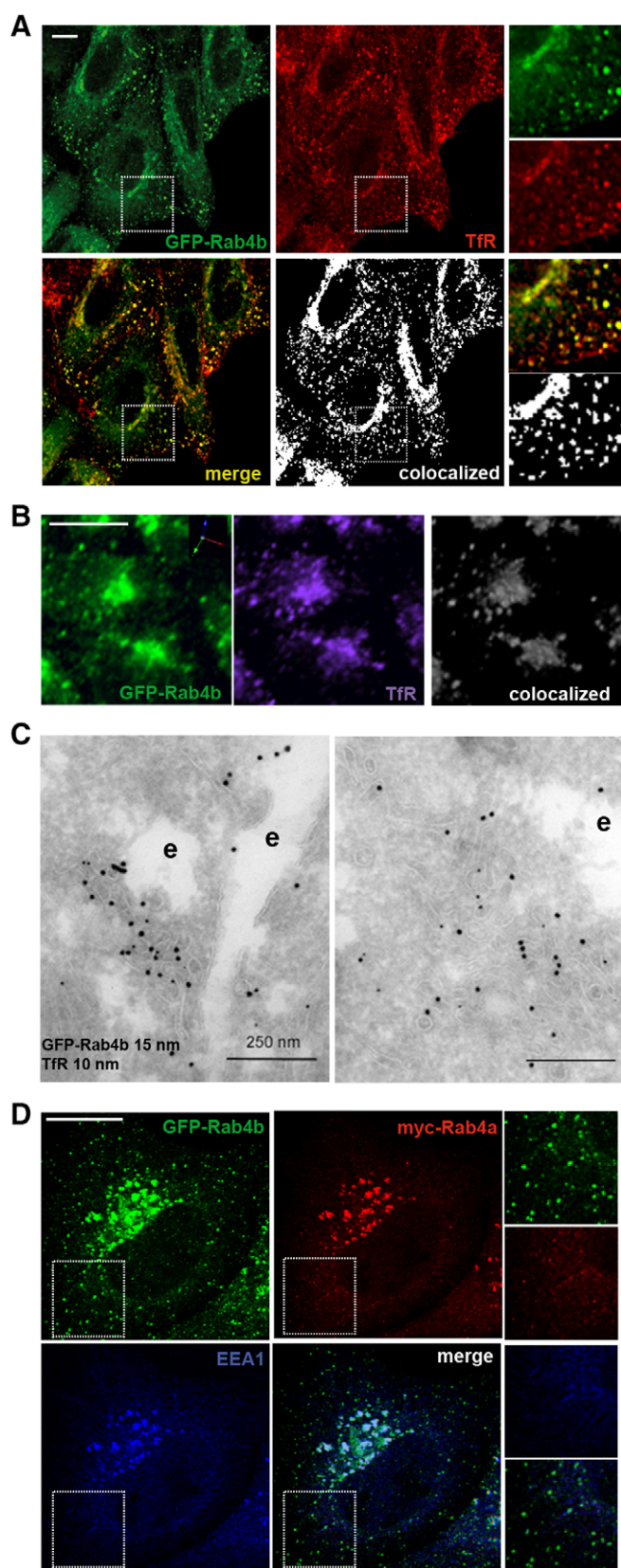


Fig. 1. TfR and expressed Rab4b are colocalised in HeLa cells. HeLa cells expressing GFP-Rab4b were treated for TfR immunofluorescence.

(A) Images of one confocal section corresponding to GFP-Rab4b (green), TfR (red), the merged image (merge) and the colocalised pixels (colocalised) are shown as well as enlarged views of the boxed regions. (B) A 3D reconstruction of GFP-Rab4b and TfR and the colocalised voxels obtained using Volocity software. (C) HeLa cells expressing GFP-Rab4b were treated for immunogold labelling in electron microscopy. GFP-Rab4b is detected with anti-GFP antibody followed by antibody against rabbit IgG coupled to 15 nm gold particles. Endogenous TfR is detected with anti-TfR antibody followed by antibody against mouse IgG coupled to 10 nm gold particles. e, endosomes. (D) HeLa cells expressing GFP-Rab4b were transiently transfected with pcDNA3-Myc-Rab4a and treated for immunofluorescence with anti-EEA1 antibodies. Images of one confocal section corresponding to GFP-Rab4b (green), Myc-Rab4a (red), EEA1 (blue), and the merged image (merge) are shown as well as enlarged views of the boxed regions. Scale bars: 10 µm (A,B,D); 250 nm (C).

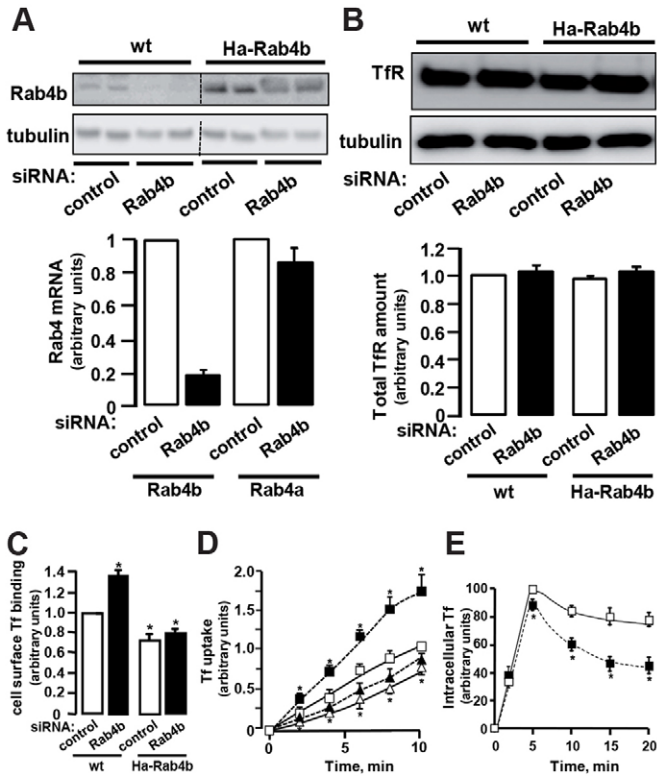


Fig. 2. Rab4b controls the recycling of TfR. Wild-type (wt) or Ha-Rab4b-expressing HeLa cells were transiently transfected with 10 nM of control or anti-Rab4b siRNA and the cells were used 48 hours later. (A) The amount of Rab4b was determined with an antibody against Rab4b (Kaddai et al., 2009) by western blotting. Tubulin was used as a loading control. The amount of mRNA encoding Rab4a and Rab4b was quantified by real-time PCR using RLP0 as an internal control. The graph represents the quantification \pm s.e.m. of three independent experiments. (B) The amount of TfR was determined using a specific antibody. The expression of Rab4a was determined using a monoclonal antibody raised against recombinant Rab4a. Tubulin was used as a loading control. The graph represents the quantification of TfR amount in three independent experiments. (C) The amount of plasma membrane TfR was determined by saturation binding of HRP-coupled TfR. The results are expressed as the percentage of binding relative to the control condition (siRNA in wt HeLa cells) and the graph represents the mean \pm s.e.m. of four experiments. (D) The capacity of the cells to internalise Tf was determined. Cells were incubated for up to 10 minutes with HRP-coupled Tf at 37°C. After incubation, the cells were subjected to acidic washes before quantifying internalised HRP-coupled Tf. The graph represents the mean \pm s.e.m. of three experiments. (E) Cells were incubated with Alexa-Fluor-488-coupled Tf for 1 hour at 4°C before shifting the cells to 37°C. Cells were subjected to acidic washes before quantification of internalised fluorescent Tf. The results are expressed as the percentage of the maximum for internalised Tf and are normalised to the plasma membrane amount of TfR determined in the same experiment. Open symbols are for cells treated with control siRNA whereas filled symbols correspond to cells treated with anti-Rab4b siRNA. Squares correspond to wt HeLa cells and triangles to HeLa cells overexpressing HA-Rab4b. * $P < 0.05$ compared with control condition in wt cells.

EEA1 and myc-Rab11. Indeed, numerous peripheral vesicles containing only Tf were visible. In wt HeLa cells that did not overexpress Myc-Rab11a, internalised fluorescent Tf was also found in the periphery of cells when Rab4b was downregulated, rather than in the perinuclear region (supplementary material Fig. S4C). Fig. 3A also reveals that Rab4b silencing induced a change

in the distribution of the recycling endosomes. When Rab4b was downregulated, Myc-Rab11 was found restricted to a central region of the cell, the labelled compartment had a more tubular appearance and fewer peripheral Rab11-containing vesicles were detected. It thus suggests that Rab4b is also important for the spatial organisation of Rab11-positive recycling endosomes.

Because Rab4b seemed to be required to target extracellular Tf to Rab11-positive recycling endosomes, we next determined whether overexpression of Rab4b could promote the entry of extracellular Tf into recycling endosomes. We previously observed that GFP-Rab4b and TfR were colocalised, and that internalised Tf was found mainly in GFP-Rab4b- and EEA1-positive perinuclear compartments, but also in more peripheral structures positive for Rab4b and negative for EEA1 (Fig. 3B). We thus questioned whether these latter structures contained markers of recycling endosomes. We first observed that mCherry-Rab11a was not enriched in these structures, whereas GFP-Rab4b and mCherry-Rab11a were partially colocalised in the perinuclear region (supplementary material Fig. S5). To avoid any bias linked to Rab11 overexpression, we determined whether these peripheral structures contained endogenous Vamp3, another marker of recycling endosomes (Daro et al., 1996). Vamp3 was also not detected in these GFP-Rab4b-positive structures in which Tf accumulated (Fig. 3B). The compartments labelled with anti-Vamp3 antibodies are likely to be recycling endosomes because Vamp3 partially colocalised with TfR but not with EEA1 in WT HeLa cells (supplementary material Fig. S6). Furthermore it was efficiently reached by internalised Tf in cells that did not express GFP-Rab4b (data not shown).

Taken together, these results indicate that Rab4b was required for Tf trafficking from early to recycling endosomes either because it directly controlled a trafficking event or because it perturbed the organisation of the recycling endosomes. Rab4b overexpression led to the genesis of structures that contained expressed Rab4b and were accessible to extracellular Tf, but devoid of early (EEA1) and recycling endocytic (Rab11/Vamp3) markers. This could suggest that intermediate vesicles of transport en route to recycling endosomes could somehow be accumulated when Rab4b was overexpressed.

Rab4b interacts with AP1 γ and localises to clathrin-coated vesicles

To understand how Rab4b controls Tf trafficking between early and recycling endosomes, we searched for Rab4b effectors. By performing a screen with an active form of Rab4b (Rab4bQ67L) of a human placenta cDNA library in the yeast two-hybrid system we identified the γ -subunit of the clathrin adaptor complex 1 (AP1 γ) as a putative Rab4b effector. We isolated a clone encoding a large region of the protein from amino acids 52 to 638. We next demonstrated that active Rab4bQ67L, but not inactive Rab4bS22N, interacted with the entire AP1 γ subunit (1–822), and also with Rabip4 but not CD2AP, two previously described Rab4a effectors (Cormont et al., 2001; Cormont et al., 2003). Rab4bQ67L did not interact with the AP1 γ -related adaptins from the AP-2 and AP-3 clathrin adaptor complexes, AP2 α and AP3 δ , respectively (Fig. 4A; supplementary material Fig. S7A). The other active mutants of endocytic Rab proteins, including Rab5, Rab6, Rab7 and Rab11, did not interact with either AP1 γ or AP1 γ (52–638) (Fig. 4B). We next determined which region of AP1 γ was required to interact with Rab4b. Adaptins and AP1 γ are organised in three distinct functional domains including the head

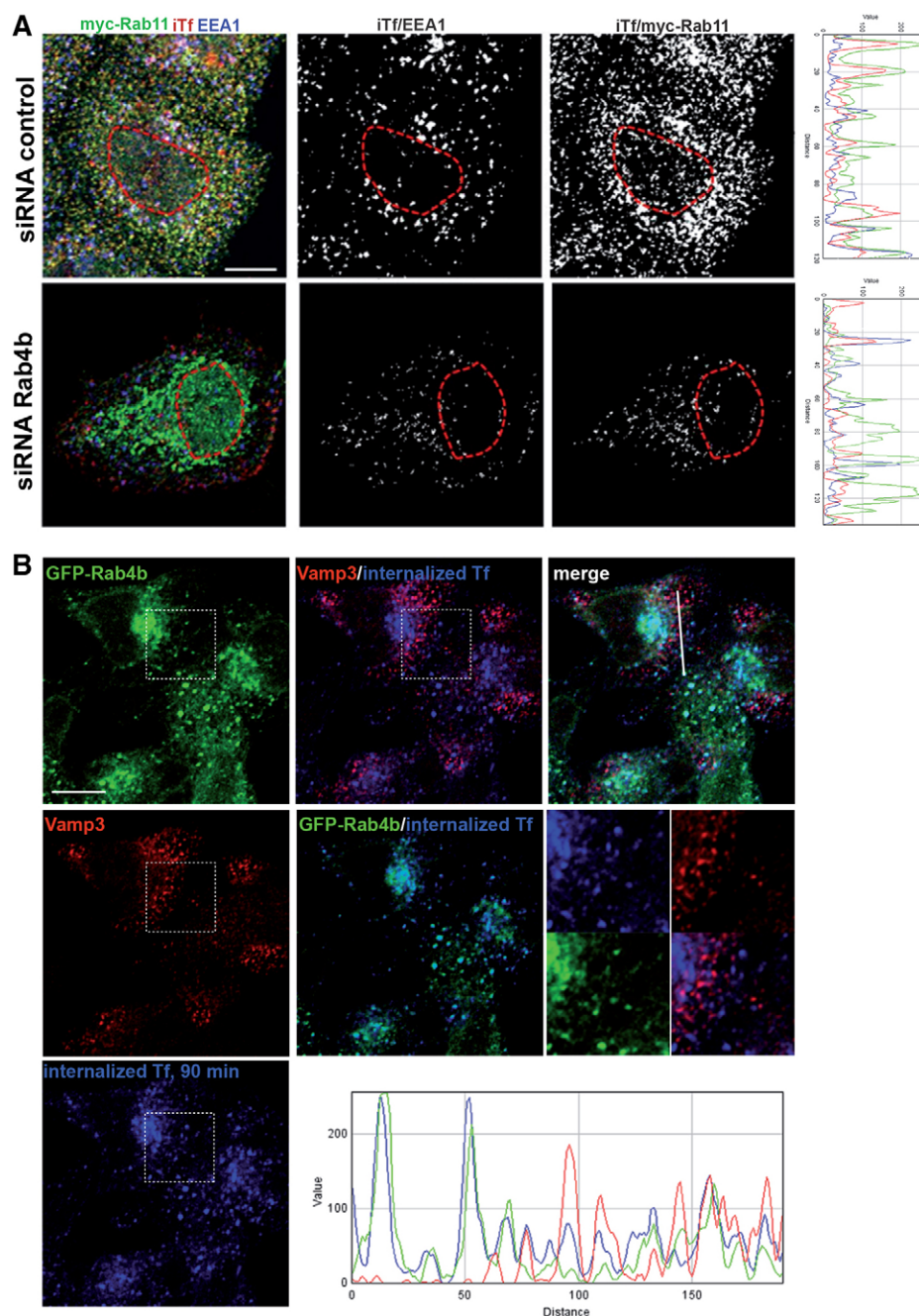


Fig. 3. Consequences of changes in Rab4b expression on Tf trafficking. (A) Wt HeLa cells were transfected with control or anti-Rab4b siRNA. After 24 hours, they were transfected with pCDNA3-Myc-Rab11 and cells were analysed 24 hours later for the capacity of extracellular Tf to reach Myc-Rab11-positive recycling endosomes in 90 minutes. The figure shows merged images of internalised Tf, Myc-Rab11 and EEA1 and the colocalised pixels between internalised Tf and either EEA1 or Myc-Rab11. A dotted line delineates the nucleus, which is slightly labelled by anti-Myc antibodies. The right panels show the intensity profile along a line for each label. (B) HeLa cells stably expressing GFP-Rab4b were incubated with Alexa-Fluor-680-coupled Tf for 90 minutes. Endogenous Vamp3 was then detected by indirect immunofluorescence. The figure shows the confocal images obtained for GFP-Rab4b, Vamp3 and internalised Tf and merged images (merge) as indicated. Enlarged views of the delineated regions and a profile analysis made along a line with ImageJ are shown. Scale bars: 10 μ m.

and trunk N-terminal domain (1–595), the hinge (595–703) and the ear domains (703–822). We observed that the interaction was lost when the first 488 amino acids were deleted. Because AP1 γ (479–638) interacted with Rab4b, we concluded that the interaction occurred between amino acids 479 and 638, located between the head and the hinge domain of AP1 γ (Fig. 4C). We named this domain AP1 γ -RBR for AP1 γ Rab4b-binding region.

We confirmed an interaction between AP1 γ and Rab4b in co-immunoprecipitation experiments. Overexpressed HA-Rab4b co-immunoprecipitated with endogenous AP1 γ when anti-AP1 γ antibodies were used compared with a non-relevant one (control mouse IgG, NR). Furthermore, a non-relevant endocytic HA-tagged protein, HA-CIN85, was not co-immunoprecipitated with AP1 γ

(Fig. 4D). We also detected co-immunoprecipitation between endogenous AP1 γ , but not AP2 α or AP3 δ , and overexpressed HA-Rab4b when HA-Rab4b was immunoprecipitated from transiently transfected HEK293 cells (mock-transfected cells were used as a control) (Fig. 4E; supplementary material Fig. S7). Similar results were obtained when HeLa cells stably expressing HA-Rab4b and wt HeLa cells were used to perform anti-HA co-immunoprecipitation (Fig. 4F). We also observed that recombinant His-tagged AP1 γ interacted more efficiently with active GST-Rab4b (GTP γ S-loaded) than with its inactive form (GDP) in a pull-down experiment (Fig. 4G).

AP1 γ is one subunit of the hetero-tetrameric AP-1 complex that binds clathrin. As expected, the β -subunit of the clathrin adaptor complex AP-1 as well as clathrin heavy chain (CHC)

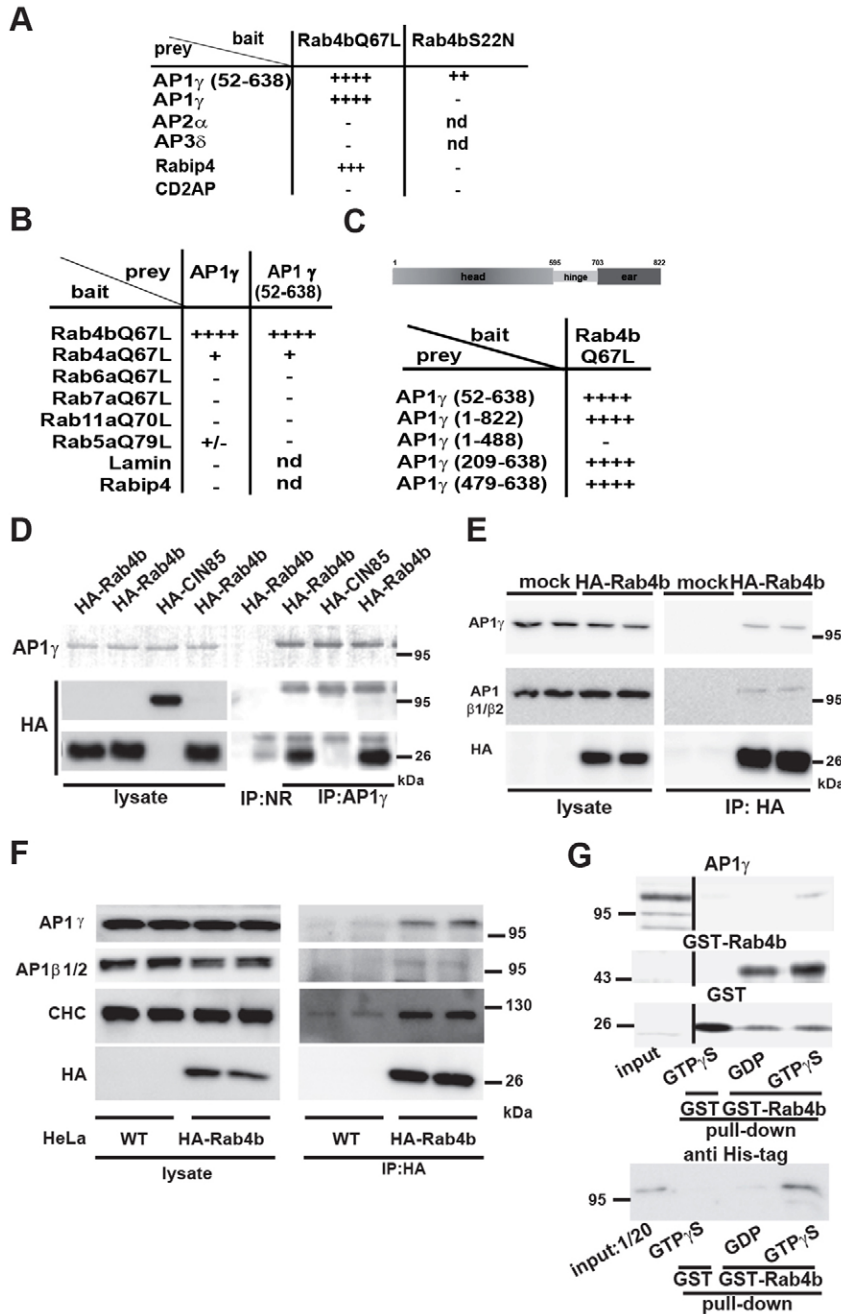


Fig. 4. Characterisation of the interaction between AP1 γ and Rab4b. (A,B,C) L40 reporter yeasts were co-transformed with vectors encoding the indicated baits and preys. Yeast was grown in the absence of Leu and Trp and β -galactosidase activity was determined on replicate filters using X-gal as a substrate. +++, blue colouration appeared within 30 minutes; ++, colouration appeared after 2 hours; +, colouration appeared in 6 hours; +/-, colouration appeared after 24 hours; -, no colouration was obtained after 24 hours. The expression of all constructs was checked by western blotting on yeast lysates (data not shown). (D) HEK293 cells were transiently transfected with HA-Rab4b or HA-CIN85. 36 hours later, lysates were prepared and subjected to immunoprecipitation using anti-AP1 γ or non-relevant antibodies (NR). Total lysates and proteins associated with the pellet were subjected to SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. The blot was incubated with anti-AP1 γ or anti-HA antibodies and revealed using TrueBlot HRP-coupled anti-mouse antibodies (eBioscience) and ECL reagent. Capture of the images was made with a Fuji LAS 3000. (E) HEK293 cells were transiently transfected with pcDNA3-HA-Rab4b or the corresponding empty vector (mock). Lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-HA antibodies. The immune pellets were analysed for the presence of AP1 γ , AP1 β 1/2 or HA as described above. (F) HeLa cells, wt or stably expressing HA-Rab4b, were subjected to immunoprecipitation with anti-HA antibodies. Total lysates and proteins associated with the pellet were analysed on a western blot to detect HA-Rab4b, AP1 γ , AP1 β 1/2 and CHC. (G) A pull-down experiment was performed using GST, GST-Rab4b loaded with GDP or GTP γ S immobilised on glutathione-Sepharose in the presence of recombinant His-tagged AP1 γ .

was found associated with Rab4b in co-immunoprecipitation experiments (Fig. 4E,F). This suggests that Rab4b can interact with the entire AP-1 complex, leading to clathrin recruitment. In accordance with an interaction between Rab4b and AP1 γ , we also observed that GFP-Rab4b and AP1 γ , but not AP2 α , were colocalised in HeLa cells, both in the perinuclear region and in punctuated peripheral structures (Fig. 5A; supplementary material Fig. S7C). Small amounts of AP3 δ labelling were detected within the GFP-Rab4b structures in the periphery of the cells, but the majority of the AP3 δ -containing vesicles did not contain GFP-Rab4b (supplementary material Fig. S7D). Furthermore, the expression of GFP-Rab4b perturbed AP1 γ labelling, which was mostly concentrated in the Golgi area in wt HeLa cells (not shown). Most of these structures also contained

internalised Tf, and expressed Rab4b was also partly colocalised with endogenous CHC (supplementary material Fig. S8A,B) and clathrin light chain (GFP-LCa, supplementary material Fig. S8C). Rab4b and CHC colocalised in perinuclear EEA1-positive structures and in peripheral EEA1-negative structures (supplementary material Fig. S8B). Immuno-EM allowed us to highlight tubules and vesicles decorated by antibodies against GFP-Rab4b and endogenous AP1 γ that were located in tubulo-vesicular regions close to an endosome. Structures positive for GFP-Rab4b and GFP-AP1 γ were coated in a manner resembling clathrin-coated vesicles (Fig. 5B). They did not present similarities with the flat bilayered clathrin lattice used by ubiquitinated cargoes to enter late multi-vesicular endosomes (Raiborg et al., 2002; Sachse et al., 2002). They looked rather like clathrin-coated

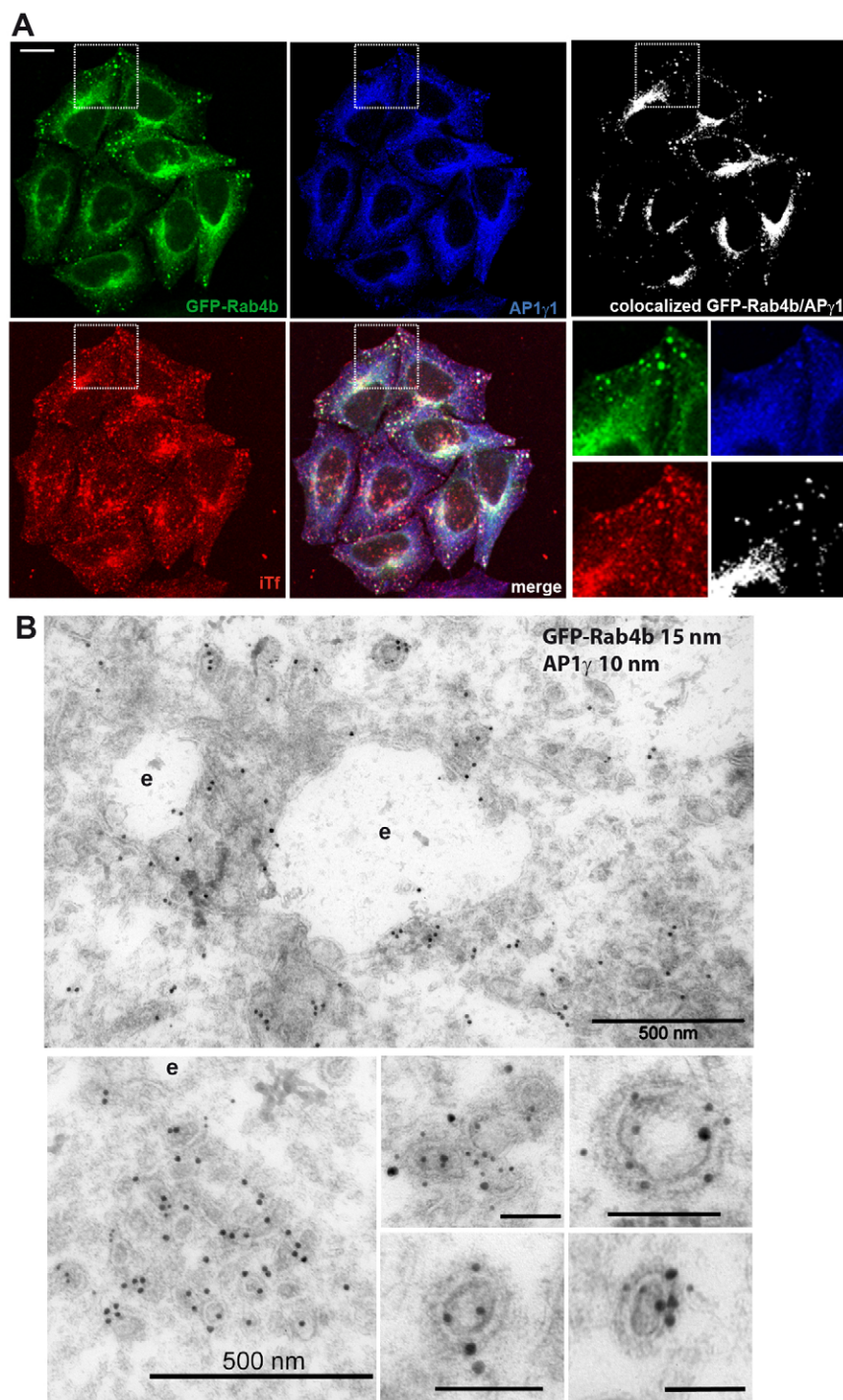


Fig. 5. AP1 γ colocalises with GFP-Rab4b. (A) HeLa cells expressing GFP-Rab4b were incubated for 90 minutes with Texas-Red-coupled Tf. They were then treated for indirect immunofluorescence with anti-AP1 γ antibodies. Cells were analysed by confocal microscopy. The figure shows the labelling corresponding to GFP-Rab4b (green), AP1 γ (blue), internalised Tf (iTf, red) and the colocalised points between GFP-Rab4b and AP1 γ . The boxed regions are also shown enlarged. Scale bar: 10 μ m (B) HeLa cells stably expressing GFP-Rab4b were treated for immunodetection in electron microscopy. Antibodies against GFP were used to detect GFP-Rab4b followed by secondary antibodies coupled to 15 nm gold particles. AP1 γ is detected with anti-AP1 γ antibody and secondary antibodies coupled to 10 nm gold particles. The figure shows typical labelling in tubulo-vesicular regions near early endosomes (e) and enlarged views (scale bars: 100 nm) of coated structures containing both AP1 γ and GFP-Rab4b found in these tubulo-vesicular regions.

tubulo-vesicular structures emanating from vacuolar early endosomes. Taken together, the co-immunoprecipitation of Rab4b with CHC and their colocalisation in electron and immunofluorescent microscopy strengthen the idea that Rab4b could organise the clathrin coat on Rab4b-positive endosomes.

Interaction between AP1 γ and Rab4b is required for control of TfR recycling

Our results suggested that Rab4b could be involved in the recruitment of a clathrin coat involved in the formation of

vesicles en route to recycling endosomes through its interaction with AP1 γ . The increase or decrease in Rab4b expression did not change the distribution of AP1 γ between the cytosol and the membranes (data not shown). However, silencing of Rab4b induced a loss of AP1 γ in light density membrane fractions separated on a glycerol gradient (supplementary material Fig. S9). Rab4b could thus be required for the association of AP1 γ with a subtype of intracellular vesicles. Interestingly, in HeLa cells expressing similar levels of GFP-Rab4a and GFP-Rab4b (GFP-Rab4a cln1), we did not detect numerous peripheral

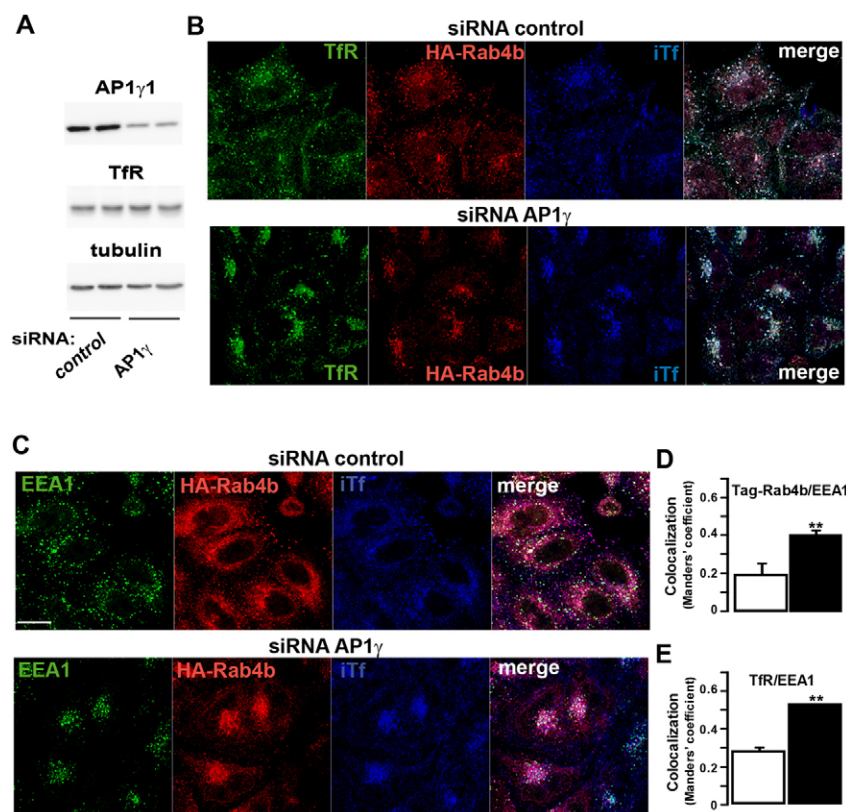


Fig. 6. AP1 γ is required for the formation of Rab4b-positive, EEA1-negative TfR-containing vesicles. HeLa cells expressing HA-Rab4b were transfected with control or anti-AP1 γ siRNA and used 48 hours later. (A) Lysates were prepared to determine the amount of AP1 γ and TfR by western blotting. Tubulin was used as loading control. (B) Cells were incubated for 90 minutes with Alexa-Fluor-680-coupled Tf before treatment for immunofluorescence of TfR and HA tag. Cells were analysed by confocal microscopy and images corresponding to TfR (green), HA-Rab4b (red), internalised Tf (iTf, blue) and the merged image of the three labels are shown. (C) Cells were incubated for 90 minutes with Alexa-Fluor-680-coupled Tf before treatments for immunofluorescence of EEA1 and the HA tag. Cells were analysed by confocal microscopy for EEA1 (green), HA-Rab4b (red) and internalised Tf (iTf, blue); merged images of the three labels are shown. (D) Confocal images of the experiment shown in C analysed using the JaCOP plug-in of ImageJ software to determine the extent of colocalisation of tagged-Rab4b with the EEA1-positive structures. White column shows control siRNA whereas the black one shows anti-AP1 γ siRNA. (E) The extent of colocalisation between TfR and EEA1 was determined as above in wild-type HeLa cells treated with control (white column) or anti-AP1 γ siRNA (black column). For D and E, four images were taken for each condition and the experiment was repeated three times. The graph shows the mean \pm s.e.m. of the Manders' coefficient corresponding to tagged-Rab4b or TfR channel within the EEA1 channel. Differences are significant with * P < 0.05 and ** P < 0.005 (unpaired Student's t -test). Scale bars: 10 μ m.

structures containing both GFP-Rab4a and AP1 γ , whereas such peripheral structures were detected when GFP-Rab4a was overexpressed to a higher level than GFP-Rab4b (supplementary material Fig. S10A–E). We next determined whether AP1 γ was involved in the control of Rab4b-containing compartments. We thus aimed to silence AP1 γ in HeLa cells stably expressing HA-Rab4b. The use of siRNA against AP1 γ yielded up to 60% inhibition of the protein expression compared with the control, and did not affect TfR expression (Fig. 6A). The inhibition occurred with a similar efficiency in each cell as proved by indirect immunofluorescence with anti-AP1 γ antibody (data not shown). We observed that the compartments containing HA-Rab4b and TfR were more concentrated in the centre of the cells when the expression of AP1 γ was decreased. Internalised Tf was also accumulated in these compartments. This suggested that the peripheral Rab4b-positive, EEA1-negative vesicles could not be formed in the absence of AP1 γ (Fig. 6B). In accordance, the extent of colocalisation between HA-Rab4b and EEA1 was increased in cells with lower expression of AP1 γ (Fig. 6C,D). Indeed, there were nearly no structures labelled with HA-Rab4b that were accessible to internalised Tf except for the EEA1-positive structures. Furthermore, the extent of colocalisation between TfR and EEA1 was also increased in wt HeLa cells expressing lower amounts of AP1 γ (Fig. 6E).

Rab4b could thus favour the sorting of TfR from early endosomes by interacting with AP1 γ . We thus wanted to determine the consequence of a block of the interaction between Rab4b and AP1 γ . We thus constructed a vector encoding a fusion protein consisting of N-terminal GFP, the Rab4b-binding region of AP1 γ and a C-terminus of the two Fyve

fingers from Hrs (GFP-AP1 γ -RBR-Fyve), which are specifically targeted to PI3P-enriched early endosomes (Gaullier et al., 1998). We verified that overexpression of this protein inhibited the interaction between HA-Rab4b and AP1 γ (Fig. 7A). HEK293 cells expressing HA-Rab4b and either GFP-Fyve or GFP-AP1 γ -RBR-Fyve were subjected to immunoprecipitation with anti-HA antibodies. We clearly observed that the amount of AP1 γ associated with HA-Rab4b was decreased by the expression of GFP-AP1 γ -RBR-Fyve compared with GFP-Fyve. We next determined whether the recycling of internalised Tf was affected by the overexpression of GFP-AP1 γ -RBR-Fyve. For this, wt HeLa cells overexpressing either GFP-Fyve or GFP-AP1 γ -RBR-Fyve were incubated for 5 minutes with Texas-Red-coupled Tf at 37°C, washed, and reincubated with non-labelled holo-Tf to prevent reinternalisation of fluorescent Tf. Fifteen minutes later, cells were processed for confocal imaging. The remaining amount of intracellular Tf in GFP-AP1 γ -RBR-Fyve-expressing cells was increased compared with the surrounding non-transfected cells. This was not observed when the cells overexpressed GFP-Fyve (Fig. 7B,C). The amount of fluorescent Tf internalised during the first 5 minutes of incubation was, however, similar in cells either expressing or not the different GFP-fusion proteins (not shown). These observations indicated that the overexpression of GFP-AP1 γ -RBR-Fyve inhibited the recycling of Tf. Intracellular Tf was blocked in compartments labelled with GFP-AP1 γ -RBR-Fyve (Fig. 7B) that were also positive for EEA1 (not shown), thus indicating that the block occurred in early endosomes. These results also strongly suggested that the interaction between Rab4b and AP1 γ is required for early endocytic sorting of TfR. But in these

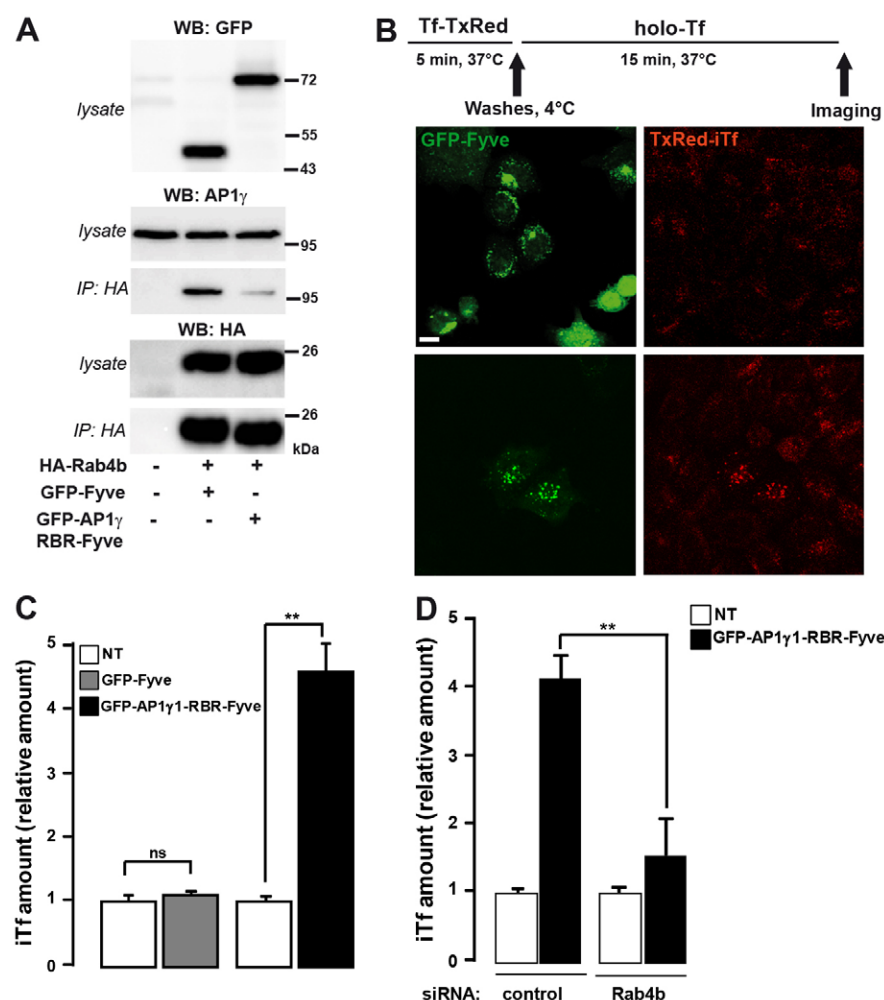


Fig. 7. Expression of GFP-AP1 γ -RBR-Fyve inhibits the recycling of internalised Tf.

(A) HEK293 cells were transfected with mock vector or HA-Rab4b, with either GFP-Fyve or GFP-AP1 γ -RBR-Fyve. 24 hours later, lysates were submitted to immunoprecipitation using anti-HA antibodies. Total lysates and proteins associated with the pellets were subjected to western blotting with anti-AP1 γ , anti-HA or anti-GFP antibodies, and revealed using TrueBlot HRP-coupled antibodies against mouse IgG for AP1 γ and HA (eBioscience) or HRP-coupled antibodies against rabbit IgG for GFP. (B) Wt HeLa cells were transiently transfected with pEGFP-Fyve or pEGFP-AP1 γ -RBR-Fyve. 24 hours later, cells were incubated for 5 minutes at 37°C with Texas-Red-coupled Tf. After an acid wash and three washes in PBS at 4°C, cells were incubated with an excess of unlabelled holo-Tf for 15 minutes. Cells were then fixed and analysed by confocal microscopy. The figure shows representative fields with HeLa cells overexpressing or not the GFP-fusion proteins. Scale bar: 10 μ m. (C) The amount of intracellular Tf (iTf) was quantified in cells expressing the GFP-fusion protein and in surrounding non-transfected cells (NT). 150 transfected and non-transfected cells were analysed in three independent experiments. In each analysed field, the amount of iTf for each cell was normalised to the amount of iTf in one of the non-transfected cells. ns, not significant; ** $P < 0.0001$ (Mann-Whitney). (D) Wt HeLa cells were transfected with control or anti-Rab4b siRNA. 24 hours later they were transfected with pEGFP-AP1 γ -RBR-Fyve. Tf recycling was studied as in B, and images were quantified as above. ** $P < 0.005$.

experimental conditions and in contrast to what happens in the absence of Rab4b, Tf was not rapidly recycled back to the plasma membrane. The inhibition of Tf recycling induced by the overexpression of GFP-AP1 γ -RBR-Fyve required Rab4b because it did not occur in its absence. The observed inhibition was thus probably due to a loss of interaction between Rab4b and endogenous AP1 γ (Fig. 7D).

Discussion

TfR recycles between intracellular compartments and the plasma membrane either from early endosomes (fast recycling) or from recycling endosomes (slow recycling), implying that it also traffics from early to recycling endosomes (Grant and Donaldson, 2009). Numerous Rab proteins are involved in TfR recycling, but a potential role of Rab4b has not been investigated. Here, we show that Rab4b is required for intracellular trafficking of TfR. The Rab4b-dependent step could be the passage between early and recycling endosomes because inhibition of Rab4b expression increased TfR fast recycling, whereas Rab4b overexpression had the opposite effect. Furthermore, inhibition of Rab4b expression prevented Tf from efficiently reaching Rab11-positive endosomes.

Surprisingly, although Rab4b expression inhibited TfR fast recycling, it did not allow the efficient entry of Tf into recycling endosomes. Indeed, internalised Tf-TfRs that were no longer in EEA1-positive early endosomes were not localised in vesicles

enriched for markers of recycling endosomes. These structures could be transport intermediaries between early and recycling endosomes and thus, some cargoes could be retained within the cell in a Rab4b-dependent manner. We previously observed that Rab4b was required for the basal retention of the glucose transporter Glut4 in adipocytes that express high level of Rab4b (Kaddai et al., 2009). It remains unclear why silencing of Rab4b did not affect the steady state distribution of TfR in adipocytes (Kaddai et al., 2009). We suggest this is due to a difference in technique sensitivity used to measure plasma membrane TfR. The Rab4b-dependent step could also be an active sorting step dependent on cargo-sorting signals. If a motif in Glut4, which is highly expressed in adipocytes, is more efficiently recognised by the sorting machinery than a motif on TfR, it could compete for TfR sorting.

We found that Rab4b was required for Tf delivery into Rab11- and Vamp3-positive recycling endosomes and that its overexpression induced the formation of Rab4b-positive, EEA1-negative structures that did not contain markers of recycling endosomes but rather of Tf-TfRs. This suggested that a vesicle budding/fusion mechanism exists for trafficking between early and recycling endosomes, and that it could be controlled by Rab4b. It has previously been proposed that trafficking between early and recycling endosomes occurs under a Rab conversion model (Sönnichsen et al., 2000) similar to the early-to-late

endocytic pathway (Poteryaev et al., 2010; Rink et al., 2005). Coordination between endocytic Rab proteins certainly exists because they share some of their effectors (Galvez et al., 2012) and this could explain why the morphology of the Rab11-positive compartment was widely affected by Rab4b silencing. Tubules and subsequent vesicles are formed as endosomes undergo Rab4a-to-Rab11 transition (van Weering et al., 2012), in accordance with a budding process at the early-to-recycling-endosome step. Furthermore, Sonnichsen and co-workers described GFP-Rab4a-containing vesicles without markers of early (Rab5) and recycling endosomes (Rab11) (Sönnichsen et al., 2000), similar to those we observed with GFP-Rab4b. However, they represent a minority of the Rab4a-containing endosomes, whereas we estimated that 50% of GFP-Rab4b-positive structures are neither in early (EEA1 negative) nor in recycling endosomes (Rab11 or Vamp3 negative), despite containing TfRs. A budding process is also supported by the *in vitro* budding assay from early endosomes of vesicles containing the recycling receptor asialoglycoprotein receptor H1 developed by Pagano and co-workers (Pagano et al., 2004). Even more interestingly, this *in vitro* budding required Rab4, but the tools used did not permit discrimination between Rab4a and Rab4b. Rab4 expression also induces the formation of synaptic-like microvesicles in an *in vitro* assay of early endosome budding (de Wit et al., 2001). Their comparison of HeLa cells expressing the same levels of GFP-Rab4b and GFP-Rab4a strongly suggests that Rab4b is more efficient at inducing the formation of GFP-Rab4-positive, EEA1-negative peripheral structures. In accordance, we found that GFP-Rab4b expression inhibited plasma membrane TfR localisation, whereas that Rab4a increased it when expressed at the same level, as previously described (McCaffrey et al., 2001; van der Sluijs et al., 1992).

The existence of a budding process controlled by Rab4b was reinforced because we found that Rab4b interacted with the AP1 γ subunit of the clathrin adaptor complex, AP-1, known for its involvement in clathrin-dependent vesicle budding at the TGN (Robinson and Bonifacio, 2001). It remains to be determined whether the interaction between active Rab4b and AP1 γ is direct, because indirect interactions could sometimes be detected in yeast two-hybrid screens and because the recombinant His-tagged AP1 γ we produced was not pure. Indeed, a previous study suggested that an AP1 γ -AP1 σ subcomplex of AP-1 interacted with active Rab4a through Rabep1/2 (Deneka et al., 2003). The authors found that the ear domain of AP1 γ interacted with Rabep1/2 and that active Rab4a was able to precipitate Rabep1/2 and AP1 γ from pig brain cytosol. However, they did not prove that the interaction between Rab4a and AP1 γ required Rabep1/2. Additional experiments will thus be required to understand the mechanisms involved in the recruitment of AP1 γ by Rab4b and to determine the contribution of other proteins, including the other subunits of AP-1, in the formation and stability of the interaction. Also, we cannot exclude that other Rab proteins, among the many found in endosomes, could interact with AP1 γ . AP-1 was also involved in retrograde transport of several cargoes from early endosomes to TGN, but the involvement of clathrin in this AP1-dependent pathway is still under discussion (Johannes and Popoff, 2008; Pfeffer, 2011). Budding of clathrin-coated vesicles from endosomes is described at the ultrastructural level, although they were found only occasionally associated with AP1 γ (Stoorvogel et al., 1996). Also, budding of vesicles containing AP-1 and coated with clathrin was also found on

common recycling endosomes (CREs) in epithelial cells (Futter et al., 1998). Interestingly, the Rab4-dependent *in vitro* budding process of recycling molecules from early endosomes was also dependent on AP-1 and clathrin (Pagano et al., 2004). Thus it suggested that recycling receptors could be sorted from early endosomes by an AP-1- and clathrin-dependent budding process. In accordance, we found that Rab4b associated with AP1 γ and clathrin heavy chain in co-immunoprecipitation experiments. GFP-Rab4b, AP1 γ , clathrin heavy and light chain also colocalised in immunofluorescence studies, and GFP-Rab4b- and AP1 γ -containing tubules and vesicles were found around early endosomes decorated in a manner reminiscent of clathrin coats. Changes in Rab4b expression modified the density of TfR-containing vesicles and Rab4b silencing induced AP1 γ loss in light vesicles, thus suggesting that Rab4b could control coat formation on TfR-containing budding vesicles. Furthermore, the inhibition of AP1 γ expression in Rab4b-expressing cells induced the loss of the more peripheral GFP-Rab4b-containing vesicles concomitantly with an increased colocalisation of GFP-Rab4b and TfR in early EEA1-positive endosomes. Interestingly, a similar change in TfR localisation was reported in cells overexpressing the dominant-negative clathrin inhibitor Hub (Bennett et al., 2001). Taken together, our results thus strongly suggest that Rab4b could coordinate the formation of TfR-containing clathrin-coated vesicles.

Previous reports described that AP-1 is involved in Tf recycling (Delevoeye et al., 2009; Gravotta et al., 2012) and suggested that AP-1 interacts with TfRs (Gravotta et al., 2012). In epithelial cells, the basolateral sorting of TfR required AP-1A and AP-1B. AP-1A targets the TfR to the basolateral plasma membrane from the TGN, whereas AP-1B has been proposed to permit TfR recycling from CREs to the basolateral membrane (Gravotta et al., 2012). However, this could be a consequence of the mistargeting of TfRs to the apical plasma membrane, indeed suggesting that AP-1B is required to maintain TfRs within the basolateral recycling pathway. The different role of the two AP-1 complexes has been explained by their different localisation, AP-1A localising predominantly at the TGN, whereas AP-1B was enriched in the TfR-containing CREs. μ 1B, but not μ 1A, was indeed shown to interact with CRE-enriched phospholipid PIP3 (Fields et al., 2010). In melanocytes, AP-1 silencing by anti- μ 1 or anti- γ siRNA accelerated Tf recycling from early endosomes to the plasma membrane (Delevoeye et al., 2009). We also observed that AP1 γ silencing increased the number of plasma membrane TfRs without affecting Tf internalisation (data not shown) in a manner similar to inhibition of Rab4b, supporting such a role in HeLa cells. Rab4b could thus recruit AP-1 to early endosomes in HeLa cells that did not express μ 1B (Ohno et al., 1999), and it could thus play a role in the general endocytic recycling pathway. We think that Rab4b probably interacts more efficiently with AP1 γ than Rab4a, because when Rab4b and Rab4a are overexpressed to the same extent, Rab4b but not Rab4a induces the formation of Rab4-positive, AP1 γ -positive, EEA1-negative peripheral structures. However, Rab4a could interact with AP1 γ as demonstrated in yeast two-hybrid screens and a higher level of Rab4a induced the formation of these structures (supplementary material Fig. S10C,E) and decreased the amount of TfR at the plasma membrane (supplementary material Fig. S10F).

Taken together, our results suggest that Rab4b and AP-1 are required to target TfRs outside the fast recycling pathway. In accordance, the inhibition of endogenous Rab4b and AP1 γ

interaction through the use of endocytic expression of the domain of AP1 γ that interacted with Rab4b (GFP-AP1 γ -RBR-Fyve) blocked TfRs in early endosomes. Under these conditions, TfRs could be engaged in the trafficking pathway to the recycling endosomes but could not be directed either in the fast or in the slow recycling pathway. We do not know the molecular mechanisms involved. They are certainly linked to the fact that Rab4b remained in interaction with GFP-AP1 γ -RBR-Fyve, but we could not rule out the possibility that overexpression of GFP-AP1 γ -RBR-Fyve blocked the TfR in early endosomes by interacting with Rab4a.

In conclusion, we found that Rab4b is an important player in the control of the steady-state distribution of TfRs because it permitted their early endocytic sorting to recycling endosomes. At the molecular level, this sorting step required the interaction between Rab4b and AP1 γ that allows for AP-1-dependent budding of TfR-containing vesicles coated with clathrin. Also of interest, our results suggest that Rab4b expression could permit generation of a novel type of endocytic vesicles that are low in early and recycling endocytic markers (schematised in supplementary material Fig. S10G). It is tempting to speculate that they could constitute specialised storage compartments in cells that naturally express high levels of Rab4b.

Materials and Methods

Antibodies

Antibodies against Vamp3 were a gift from Dr Thierry Galli (Institut Jacques Monod, Paris, France). Rabip4 antibodies were described previously (Mari et al., 2006). Rab4b antiserum was produced by immunising rabbits with the C-terminal peptide of Rab4b coupled to KLH (Eurogentec, Liège, Belgium). mAb 100/3 against AP1 γ and tubulin were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). mAb 100/2 (Sigma-Aldrich) and mAb AP6 (Thermo Scientific, Rockford, IL) against α -adaptin was used in western blot experiments and immunofluorescence, respectively. mAb against EEA1, anti δ -adaptin and Rab4 and rabbit polyclonal anti-GFP antibodies were from BD Biosciences (Palo Alto, CA). Rabbit mAb anti-EEA1 was from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Rabbit polyclonal anti-GFP antibody for electron microscopy was from ICL (Portland, OR). mAb anti-HA was from Covance (Hemeryville, CA) and rabbit serum anti-HA was from MBL International (Clinisciences, Nanterre, France). mAb anti-TfR and Alexa-Fluor-488-coupled secondary antibodies were from Invitrogen (Camarillo, CA). mAb anti-AP β 1/2 (100/1) was from Santa Cruz Biotechnology. mAb X22 anti-CHC was from Thermo Scientific (Rockford, IL). mAb anti-Myc was from Roche Diagnostics (Indianapolis, IN). HRP-, Texas-Red- and Cy5-coupled anti-species antibodies and Tf-HRP were from Jackson ImmunoResearch Europe (Newmarket, UK). 10-nm-Gold-coupled goat anti-mouse IgG and 15-nm-Gold-coupled goat anti-rabbit IgG for electron microscopy were from BBI International (Cardiff, UK).

Plasmids

pEGFP-Rab4b and pcDNA3-HA-Rab4b were described previously (Kaddai et al., 2009). pEGFP-Rab4a, Myc-Rab4a, pDsRed-Rabip4, pcDNA3-Myc Rab11b, pLex-Rab4aQ67L/S22N, pLex-lamin, pLex-Rabip4, pAct-Rabip4, pAct-CD2AP have also been described (Cormont et al., 2001; Cormont et al., 2003). pEGFP-Fyve was a gift from Dr H. Stenmark (Centre for Cancer Biomedicine, Montebello, Norway). pLex-Rab5aQ79L, pLex-Rab6aQ72L and pIRES-Hygro-mCherry-Rab11a were gifts from Dr Bruno Goud (Institut Curie, Paris, France). pLex-Rab7aQ79L was a gift from Dr Cecilia Bucci (Salento University, Lecce, Italy). pLex-Rab11aQ70L was a gift from Dr Jean Salamero (Institut Curie, Paris, France). pACT2-AP1 γ was provided by Dr J. Bonifacino. pACT2-AP2 α and pGAD-AP3 δ were provided by Dr A. Benmerah. pEGFP-LCa was a gift from Dr P. Cossart (Institut Pasteur, Paris, France).

The AP1 γ -RBR (AP1 γ aa 479–638) was introduced in-frame between GFP and Fyve fingers. pEGFP-Fyve was digested with *Xho*I and *Eco*RI located within the polylinker between GFP and Fyve fingers. The cDNA corresponding to aa 479–638 of AP1 γ was amplified by PCR using pP6-AP1 γ aa 52–638 as template and the following primers: forward, 5'-gcccgtactgagagatgccagccccc-3' with a *Xho*I site in the 5'; and reverse, 5'-catgcgaattctgccaggactgagg-3' with *Eco*RI in the 5'. The fragment was digested with *Xho*I and *Eco*RI, purified and then ligated into digested pEGFP-Fyve. Rab4b wt, Rab4b Q67L and Rab4b S22N were amplified by PCR by using pEGFP-Rab4b wt/Q67L/S22N as template and a forward primer containing an *Spe*I site in 5' and a reverse one with a *Pac*I site in order to subclone it in-frame with LexA into the vector pB27 (Hybrigenics Services SAS, Paris,

France) predigested with *Spe*I and *Pac*I. The C-terminal deletion of AP1 γ (1–488) was performed by introducing a STOP codon at position 488 by site-directed mutagenesis (Cormont et al., 2001). The construction of the N-terminal deletion of AP1 γ (1–638) (aa 209–638 and aa 479–638) were performed by subcloning the corresponding fragment amplified by PCR into the *Sma*I site of pAct2. The products of the ligations were digested with *Sma*I before *E. coli* transformation. The orientation of the insert was tested by PCR. pGEX-2T-Rab4b was obtained by subcloning of a PCR-amplified Rab4b fragment in-frame with GST in the *Sma*I site of pGEX-2T. pTrcHis-AP1 γ was obtained by subcloning the *Xho*I-BamHI-digested fragment from the pAct2-AP1 γ vector into pTrcHis C vector (Invitrogen). All the constructions were verified by sequencing (GATC Biotech SARL, Mulhouse, France).

siRNA

The double-strand siRNAs targeting Rab4b and Rabip4 were synthesised by Eurogentec (Seraing, Belgium). The sequences were as follows: Rab4b forward, CAGGACUCCACACACAAAdTdT; Rab4b reverse, UUGUGUGUUGG-AGUCCUGdTdT. siRNA against AP1 γ was from Thermo Scientific Dharmacon (On-target plus SMART pool). We used as control siRNA the negative control from Eurogentec or the negative control from Dharmacon. siRNAs were used at a final concentration of 10–20 nM.

Cells

HeLa cells (a gift from T. L. Cover, Vanderbilt, TN) were cultured and transfected as described (Monzo et al., 2005). HeLa cells stably expressing GFP-Rab4b, HA-Rab4b or GFP-Rab4a were selected with geneticin after transfection with pEGFP-Rab4b, pEGFP-Rab4a or pcDNA3-HA-Rab4b, respectively, and maintained in culture in the presence of antibiotics. HEK293 cells were cultured and transfected as described previously (Murdaca et al., 2004).

Yeast two-hybrid screening and interaction measurement

Yeast two-hybrid screening was performed by Hybrigenics Services SAS (Paris, France) by using pB27-Rab4bQ67L as the bait and the human placenta₂₄ prey library. For interaction measurements, the yeast reporter strain L40 was co-transformed with a pB27-pLex fusion protein vector and pACT2-pP6 fusion protein using a lithium acetate basic method and grown on synthetic medium lacking leucine and tryptophan. Induction of the reporter gene *lacZ* was determined using X-gal as substrate (Cormont et al., 2001).

Pull-down experiments

GST-Rab4b or GST was purified as described previously (Cormont et al., 2003). His-AP1 γ was purified from *E. coli* transformed with pTrcHis-AP1 γ and cultured overnight with 100 μ M IPTG. Lysate was loaded on Pro-Bound resin (Invitrogen). After washing, the bound proteins were eluted by increasing the concentration of imidazol (15 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM). The fractions containing His-AP1 γ were pooled and dialysed against 25 mM HEPES, pH 7.8, containing 100 mM NaCl. His-AP1 γ was enriched among the bacterial proteins but other bacterial proteins that bound the resin were co-purified. The pull-down assay was performed as described (Cormont et al., 2003) except that the glutathione-Sepharose beads were washed in the presence of 0.05% Triton X-100. Proteins within the gel were coloured using InstantBlue (Expedeon) and image were captured with a FujiLAS 3000 in the digitised mode.

Transmission electron microscopy

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) for 2 hours and were processed for ultracyromicrotomy according to a modified Tokuyasu method (Tokuyasu, 1973). Cell suspension was spun down in 10% gelatin. After immersion in 2.3 M sucrose in PB overnight at 4°C, the samples were frozen in liquid nitrogen. 70 nm ultrathin cryosections were prepared with an ultracyromicrotome (Leica EMFCS, Austria) and mounted on formvar-coated nickel grids (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Immunolabelled cells on grids were processed with an automated immunogold labelling system (Leica EM IGL). The grids were incubated successively in: (1) PBS containing 50 mM NH₄Cl in PBS with 1% BSA; (2) antibodies incubated in PBS with 1% BSA for 1 hour; (3) PBS with 0.1% BSA for gold particle-conjugated secondary antibodies; (4) PBS with 0.1% BSA; (5) PBS alone. The samples were fixed for 10 minutes with 1% glutaraldehyde, rinsed in distilled water and contrasted with 1.8% methylcellulose and 0.3% uranyl acetate on ice. After air drying, sections were examined under a JEOL 1400 transmission electron microscope.

Confocal immunofluorescence microscopy

HeLa cells grown on glass coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde and then incubated in 10 mM NH₄Cl. They were permeabilised with PBS containing 1% BSA, 1% SVF and 0.05% saponin or 0.1% Triton X-100. They were then incubated with primary antibodies, washed, and incubated with fluorochrome-coupled secondary antibodies (Alexa Fluor 488, Texas Red or Cy5). After

washing, coverslips were mounted on slides using Mowiol 4-88 in a glycerol-base mounting medium. Confocal analysis was performed with a LSM510META confocal microscope with a PL APO 63× 1.40 NA objective (Carl Zeiss SAS, Göttingen, Germany) available at the Ibis-labelled MICA platform of the institute by sequential excitation at 488 nm, 568 nm and 647 nm. Image processing was performed with ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) or Volocity 5.0 (PerkinElmer). Finally, images were merged and figures created with Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA). The quantification of iTf intensity was performed on 3D images obtained from ten confocal sections for ten fields using Volocity 5.0 software (Perkin Elmer). The same threshold was applied on each 3D image and values were normalised by the number of cells. One image in the control condition at time 0 was arbitrary taken to 1 and the other results were expressed relative to this one.

Tf binding and recycling assays

Cells were serum-deprived for 1 hour before the experiments. The amount of TfR at the plasma membrane was measured by saturation binding of HRP-coupled Tf at 4°C for 2 hours. Non-specific binding was determined in the presence of an excess of Holo-Tf and represents less than 10% of the total binding. At the end of the incubation, cells were washed twice in PBS with 2% BSA and three times in PBS. The amount of HRP was determined by quantifying the amount of HRP-Tf remaining associated with the cells using fast o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) tablet sets (Sigma-Aldrich). The amount of TfRs at the cell surface was determined by Scatchard analysis of bound HRP-Tf (total binding minus non-specific binding). Results were normalised to the amount of protein determined with the Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL).

Internalisation was measured by incubating cells for increasing period of time with HRP-Tf at 37°C. After this, cells were incubated at 4°C for 2 minutes in acidic buffer (50 mM glycine, 100 mM NaCl, pH 3.0) and washed three times in PBS. Cells were permeabilised with 0.5% Triton X-100 and intracellular HRP-Tf was quantified as above.

Internalisation/recycling assay was performed as described previously (Montagnac et al., 2011). Cells grown on coverslips were incubated at 4°C with 10 µg/ml of Alexa-Fluor-488-Tf (Invitrogen) for 1 hour. After washing in ice-cold PBS with 1% BSA, coverslips were reincubated at 37°C in serum-free culture medium complemented with an excess of Holo-Tf during increasing period of times. Cells were then incubated at 4°C for 2 minutes in acidic buffer and three times with PBS. Cells were fixed in 2% paraformaldehyde and detached from the coverslip using PBS with 20 mM EDTA. The amount of TfR at the plasma membrane was measured by fixing the cells before shifting them at 37°C and normalised to the cell-associated Alexa-Fluor-488-Tf amount at each time point of the assay. The amount of cell-associated Alexa-Fluor-488-Tf was determined on a MACSQuant analysis system (Miltenyi Biotec SAS, Paris, France). 10 000 cells were analysed. Background fluorescence was measured from acid-washed cells just after the binding step and the value was subtracted from all time points. Statistical analyses were performed using paired Student's *t*-test.

Co-immunoprecipitation

Cells expressing HA-Rab4b or not were washed and solubilised in Tris-HCl, pH 7.4, containing 1% Triton X-100, 10 mM EDTA, 137 mM NaCl and protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics). Lysates (500 µg of protein) were incubated with protein-G-Sepharose beads pre-incubated with 4 µg of antibodies (anti-HA or anti-AP1γ). After a night under agitation at 4°C, beads were washed four times with solubilisation buffer and three times in PBS. Dried beads were resuspended in Laemmli buffer and proteins of the immune pellet were analysed by SDS-PAGE followed by western blotting.

Glycerol gradient centrifugation

Subcellular fractionation on glycerol gradients was performed as previously described (Pérez-Victoria et al., 2008).

Acknowledgements

We thank Drs B. Goud, A. Stenmark, S. Giordano, P. Cossard, C. Bucci, J. Salamero, J. Bonifacino for the gift of plasmids. We thank Dr T. Galli for the gift of anti-Vamp3 antibody. We thank Dr Y. Le Marchand-Brustel for critical reading of the manuscript. We thank Dr E. Lemichez and A. Doye for their help for the purification of recombinant proteins.

Author contributions

P.L., L.-G.S., G.J., C.F., P.D. and C.M. performed experiments. C.M. designed the study and the experiments. B.A., T.J.-F. and C.M. interpreted the data and wrote the manuscript.

Funding

Work was supported by INSERM, the University of Nice-Sophia Antipolis and the ANR [grant number ANR-07-BLAN-046] to C.M. Gilleron Jérôme is supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). The Conseil Général des Alpes-Maritimes, The Conseil Régional PACA, the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) are acknowledged for their financial support of the Ibis Imaging Platform Mica of the C3M.

Supplementary material available online at

<http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.130575/-/DC1>

References

- Bennett, E. M., Lin, S. X., Towler, M. C., Maxfield, F. R. and Brodsky, F. M. (2001). Clathrin hub expression affects early endosome distribution with minimal impact on receptor sorting and recycling. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2790-2799.
- Bonifacino, J. S. and Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 395-447.
- Chen, Y., Wang, Y., Zhang, J., Deng, Y., Jiang, L., Song, E., Wu, X. S., Hammer, J. A., Xu, T. and Lippincott-Schwartz, J. (2012). Rab10 and myosin-Va mediate insulin-stimulated GLUT4 storage vesicle translocation in adipocytes. *J. Cell Biol.* **198**, 545-560.
- Cormont, M., Mari, M., Galmiche, A., Hofman, P. and Le Marchand-Brustel, Y. (2001). A FYVE-finger-containing protein, Rabip4, is a Rab4 effector involved in early endosomal traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1637-1642.
- Cormont, M., Metón, L., Mari, M., Monzo, P., Keslair, F., Gaskin, C., McGraw, T. E. and Le Marchand-Brustel, Y. (2003). CD2AP/CMS regulates endosome morphology and traffic to the degradative pathway through its interaction with Rab4 and c-Cbl. *Traffic* **4**, 97-112.
- Daro, E., van der Sluijs, P., Galli, T. and Mellman, I. (1996). Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9559-9564.
- de Wit, H., Lichtenstein, Y., Kelly, R. B., Geuze, H. J., Klumperman, J. and van der Sluijs, P. (2001). Rab4 regulates formation of synaptic-like microvesicles from early endosomes in PC12 cells. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3703-3715.
- Delevoye, C., Hurbain, L., Tenza, D., Sibarita, J. B., Uzan-Gafsou, S., Ohno, H., Geerts, W. J. C., Verkleij, A. J., Salamero, J., Marks, M. S. et al. (2009). AP-1 and KIF13A coordinate endosomal sorting and positioning during melanosome biogenesis. *J. Cell Biol.* **187**, 247-264.
- Deneka, M., Neef, M., Popa, I., van Oort, M., Sprong, H., Oorschot, V., Klumperman, J., Schu, P. and van der Sluijs, P. (2003). Rabaptin-5/alpha/rabaptin-4 serves as a linker between rab4 and gamma(1)-adapin in membrane recycling from endosomes. *EMBO J.* **22**, 2645-2657.
- Eggers, C. T., Schafer, J. C., Goldenring, J. R. and Taylor, S. S. (2009). D-AKAP2 interacts with Rab4 and Rab11 through its RGS domains and regulates transferrin receptor recycling. *J. Biol. Chem.* **284**, 32869-32880.
- Fields, I. C., King, S. M., Shteyn, E., Kang, R. S. and Fölsch, H. (2010). Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate localization in recycling endosomes is necessary for AP-1B-dependent sorting in polarized epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **21**, 95-105.
- Futter, C. E., Gibson, A., Allchin, E. H., Maxwell, S., Ruddock, L. J., Odorizzi, G., Domingo, D., Trowbridge, I. S. and Hopkins, C. R. (1998). In polarized MDCK cells basolateral vesicles arise from clathrin-gamma-adapin-coated domains on endosomal tubules. *J. Cell Biol.* **141**, 611-623.
- Galvez, T., Gilleron, J., Zerial, M. and O'Sullivan, G. A. (2012). SnapShot: Mammalian Rab proteins in endocytic trafficking. *Cell* **151**, 234-234, e2.
- Gaulhier, J. M., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., Stenmark, H. and Aasland, R. (1998). FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* **394**, 432-433.
- Goueli, B. S., Powell, M. B., Finger, E. C. and Pfeffer, S. R. (2012). TBC1D16 is a Rab4A GTPase activating protein that regulates receptor recycling and EGF receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 15787-15792.
- Grant, B. D. and Donaldson, J. G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 597-608.
- Gravotta, D., Carvajal-Gonzalez, J. M., Mattera, R., Deborde, S., Banfelder, J. R., Bonifacino, J. S. and Rodriguez-Boulán, E. (2012). The clathrin adaptor AP-1A mediates basolateral polarity. *Dev. Cell* **22**, 811-823.
- Gurkan, C., Lapp, H., Alory, C., Su, A. I., Hogenesch, J. B. and Balch, W. E. (2005). Large-scale profiling of Rab GTPase trafficking networks: the memprobe. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3847-3864.
- Hoogenraad, C. C., Popa, I., Futai, K., Martinez-Sanchez, E., Wulf, P. S., van Vlijmen, T., Dortland, B. R., Oorschot, V., Govers, R., Monti, M. et al. (2010). Neuron specific Rab4 effector GRASP-1 coordinates membrane specialization and maturation of recycling endosomes. *PLoS Biol.* **8**, e1000283.
- Johannes, L. and Popoff, V. (2008). Tracing the retrograde route in protein trafficking. *Cell* **135**, 1175-1187.
- Kachhap, S. K., Faith, D., Qian, D. Z., Shabbeer, S., Galloway, N. L., Pili, R., Denmeade, S. R., DeMarzo, A. M. and Carducci, M. A. (2007). The N-Myc down regulated Gene1 (NDRG1) is a Rab4 effector involved in vesicular recycling of E-cadherin. *PLoS ONE* **2**, e844.

- Kaddai, V., Gonzalez, T., Keslair, F., Grémeaux, T., Bonnafous, S., Gugenheim, J., Tran, A., Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y. and Cormont, M. (2009). Rab4b is a small GTPase involved in the control of the glucose transporter GLUT4 localization in adipocyte. *PLoS ONE* **4**, e5257.
- Kang, H. J., Voleti, B., Hajszan, T., Rajkowska, G., Stockmeier, C. A., Licznarski, P., Lepack, A., Majik, M. S., Jeong, L. S., Banasr, M. et al. (2012). Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nat. Med.* **18**, 1413-1417.
- Krawczyk, M., Leimgruber, E., Seguin-Estévez, Q., Dunand-Sauthier, I., Barras, E. and Reith, W. (2007). Expression of RAB4B, a protein governing endocytic recycling, is co-regulated with MHC class II genes. *Nucleic Acids Res.* **35**, 595-605.
- Mallard, F., Antony, C., Tenza, D., Salamero, J., Goud, B. and Johannes, L. (1998). Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *J. Cell Biol.* **143**, 973-990.
- Mari, M., Monzo, P., Kaddai, V., Keslair, F., Gonzalez, T., Le Marchand-Brustel, Y. and Cormont, M. (2006). The Rab4 effector Rabip4 plays a role in the endocytotic trafficking of Glut 4 in 3T3-L1 adipocytes. *J. Cell Sci.* **119**, 1297-1306.
- Maxfield, F. R. and McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 121-132.
- McCaffrey, M. W., Bielli, A., Cantalupo, G., Mora, S., Roberti, V., Santillo, M., Drummond, F. and Bucci, C. (2001). Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS Lett.* **495**, 21-30.
- Montagnac, G., de Forges, H., Smythe, E., Gueudry, C., Romao, M., Salamero, J. and Chavrier, P. (2011). Decoupling of activation and effector binding underlies ARF6 priming of fast endocytic recycling. *Curr. Biol.* **21**, 574-579.
- Monzo, P., Gauthier, N. C., Keslair, F., Loubat, A., Field, C. M., Le Marchand-Brustel, Y. and Cormont, M. (2005). Clues to CD2-associated protein involvement in cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* **16**, 2891-2902.
- Murdaca, J., Treins, C., Monthouël-Kartmann, M. N., Pontier-Bres, R., Kumar, S., Van Obberghen, E. and Giorgetti-Peraldi, S. (2004). Grb10 prevents Nedd4-mediated vascular endothelial growth factor receptor-2 degradation. *J. Biol. Chem.* **279**, 26754-26761.
- Ohno, H., Tomemori, T., Nakatsu, F., Okazaki, Y., Aguilar, R. C., Foelsch, H., Mellman, I., Saito, T., Shirasawa, T. and Bonifacino, J. S. (1999). μ 1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett.* **449**, 215-220.
- Pagano, A., Crottet, P., Prescianotto-Baschong, C. and Spiess, M. (2004). In vitro formation of recycling vesicles from endosomes requires adaptor protein-1/clathrin and is regulated by rab4 and the connector rabaptin-5. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4990-5000.
- Pereira-Leal, J. B. and Seabra, M. C. (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* **313**, 889-901.
- Pérez-Victoria, F. J., Mardones, G. A. and Bonifacino, J. S. (2008). Requirement of the human GARP complex for mannose 6-phosphate-receptor-dependent sorting of cathepsin D to lysosomes. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2350-2362.
- Pfeffer, S. R. (2011). Entry at the trans-face of the Golgi. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a005272.
- Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M. and Spang, A. (2010). Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* **141**, 497-508.
- Raiborg, C., Bache, K. G., Gillooly, D. J., Madhus, I. H., Stang, E. and Stenmark, H. (2002). Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat. Cell Biol.* **4**, 394-398.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735-749.
- Robinson, M. S. and Bonifacino, J. S. (2001). Adaptor-related proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 444-453.
- Sachse, M., Urbé, S., Oorschot, V., Strous, G. J. and Klumperman, J. (2002). Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1313-1328.
- Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. and Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.* **149**, 901-914.
- Stenmark, H. (2012). The Rabs: a family at the root of metazoan evolution. *BMC Biol.* **10**, 68.
- Stoorvogel, W., Oorschot, V. and Geuze, H. J. (1996). A novel class of clathrin-coated vesicles budding from endosomes. *J. Cell Biol.* **132**, 21-33.
- Tokuyasu, K. T. (1973). A technique for ultracytometry of cell suspensions and tissues. *J. Cell Biol.* **57**, 551-565.
- van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Måle, P., Goud, B. and Mellman, I. (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* **70**, 729-740.
- van Weering, J. R., Verkade, P. and Cullen, P. J. (2012). SNX-BAR-mediated endosome tubulation is co-ordinated with endosome maturation. *Traffic* **13**, 94-107.

